中药科学鉴定方法与技术丛书

张贵君　主编

常用中药生物鉴定

张贵君　李晓波　李仁伟　等编著



化学工业出版社
化学与应用化学出版中心

中药科学鉴定方法与技术丛书

- 常用中药化学鉴定
- 常用中药显微鉴定
- 常用中药光谱鉴定
- 常用中药薄层色谱鉴定
- 常用中药液相与气相色谱鉴定
- 常用中药安全性检测
- 常用中药生物鉴定
- 常用中药物理常数鉴定
- 常用中药鉴定名词图解
- 常用中药商品鉴定

ISBN 7-5025-7842-0

9 787502 578428 >

销售分类建议：医药/药学
化工/分析技术

ISBN 7-5025-7842-0
定价：49.00元

中药科学鉴定方法与技术丛书

张贵君　主编

常用中药生物鉴定

张贵君　李晓波　李仁伟　等编著

化学工业出版社
化学与应用化学出版中心
·北京·

（京）新登字 039 号

图书在版编目（CIP）数据

常用中药生物鉴定/张贵君等编著．—北京：化学工业出版社，2006.1
（中药科学鉴定方法与技术丛书）
ISBN 7-5025-7842-0

Ⅰ．常…　Ⅱ．张…　Ⅲ．生物鉴定-中药鉴定学
Ⅳ．R28

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2005）第 128295 号

中药科学鉴定方法与技术丛书
张贵君　主编
常用中药生物鉴定
张贵君　李晓波　李仁伟　等编著
责任编辑：任惠敏
文字编辑：周　倜　张春娥　赵爱萍
责任校对：蒋　宇
封面设计：郑小红
*
化学工业出版社
化学与应用化学出版中心 出版发行
（北京市朝阳区惠新里 3 号　邮政编码 100029）
购书咨询：(010)64982530
(010)64918013
购书传真：(010)64982630
http://www.cip.com.cn
*
新华书店北京发行所经销
大厂聚鑫印刷有限责任公司印刷
三河市延风装订厂装订
开本 720mm×1000mm　1/16　印张 26¼　字数 497 千字
2006 年 1 月第 1 版　2006 年 1 月北京第 1 次印刷
ISBN 7-5025-7842-0
定　价：49.00 元

前　言

中药是治疗疾病和卫生保健的特殊物质，它的使用价值是由其属性所决定的，其属性构成了使用价值的物质基础，而使用价值集中体现为品质。中药的质量不合格，就失去了使用价值。为保证临床用药的安全性、有效性、稳定性和可控性，必须对其品质进行科学的鉴定，制定出规范化的质量标准。

中药的品质鉴定是一个复杂的关键问题，评价中药品质一定要以疗效为准绳。重视中药药效与形态特征、理化特征和生物特征的相关性研究，根据它们的相关性评价中药品质就比较客观。

以往对中药的鉴定多把研究对象局限在中药材上，通常认为中药鉴定就是鉴别药材的真伪，这是一个误区。众所周知，中药绝大多数是以复方或制剂的形式进入临床，所以对中成药的鉴定至关重要。如果鉴定研究脱离了中药应用价值这一基本目标，也就迷失了研究的方向。张贵君教授强调："在中药鉴定的科学研究过程中，只有把中药材、饮片、复方及其制剂的鉴定方法与鉴别特征联系起来，采用综合的方法评价中药的品质，进行关键技术的整合，这样才能真正达到鉴定目的。"这是中药鉴定学科领域不可忽视的一个关键性问题。目前，从整体上来综合评价中药品质的研究较少，中药鉴定方法学专著更是凤毛麟角，药材、饮片和中成药的鉴定研究出现互相脱节的现象，由于受传统的思想影响，有些先进技术没有真正应用到实际工作中去，应该加大这方面的研究力度。我们认为，中药要实现现代化，必须紧密结合中药生产和临床应用的实际，建立综合品质鉴定和全面的质量管理（GSP）的科学体系；中药鉴定的对象是复杂的和多种多样的，重要的是解决方法学的问题，中药鉴定的方法和技术要不断创新，这样才能不断地精练和提升中药的质量标准。为此，我们组织编写了《中药科学鉴定方法与技术丛书》，旨在为中药的现代化贡献力量。

中药品质评价的方法是中药现代化的关键，没有中药品质评价方法的现代化，就不能保证中药的质量。在长期的生产和医疗实践中，人们积累了有关中药品质评价的丰富经验和方法，为中药品质的评价和质量控制奠定了坚实的基础。

在中药品质的现代评价方法中，中药的生物鉴定法就是其重要内容之一。它是采用生物效应和基因等生物学的方法鉴定其品质的一种方法，是 21 世纪产生并发展起来的中药鉴定最新方法。为此，我们对该方法进行了较为系统的整理和科学总结，旨在促进中药品质评价方法的科学化进程。

本书共 8 章，重点阐述了中药生物鉴定的基本概念、基本理论和基本方法，

并介绍了这些方法在常用中药品质鉴定中的运用。中药生物鉴定法是一种实用技术，它是利用中药或其所含的化学组分对生物体的作用强度，以及用生命信息物质（DNA、蛋白质等）特异性遗传标记特征和基因表达差异等来鉴定中药品质的一种方法。换言之，就是通过对中药中的生命信息物质和生物效应等的识别，以达到品质鉴定目的的一种方法。该鉴定方法既能体现中药的内在质量，又具有准确性和科学性等特征。例如生物效价鉴定法就是利用生物体的反应来鉴定中药有效组分（或有效成分）的含量或效价，测定药物的疗效和毒性的方法。再如动植物药的性状随入药部位、加工方法的变化而变化，这些变化常给中药鉴定带来困难，用生物鉴定法就很容易解决这些问题。该书介绍了生物鉴定的成功方法和技术，充分反映了现代中药品质评价方法的最新成果和发展方向。

本书由北京中医药大学、上海交通大学、重庆医科大学、黑龙江大学、大庆市第二医院等长期从事中药品质鉴定研究的专家撰写，可作为中医药类和医药类专业的博士和硕士研究生、本科生的专业教材，也可作为执业中药师的培训教材，亦是医药行业的各层次人员提高专业素质的参考书。

本书由张贵君主持编写，李晓波、李仁伟、白根本参与编著相关章节并参与全书稿的组织与审阅。承担各单章编写工作的分别为：第一章（张贵君）、第二章（白根本、苏民、陆景珊、张贵君、李仁伟）、第三章（张贵君、李仁伟、苏民）、第四章（李仁伟、王奕洁、张贵君）、第五章（李仁伟、王奕洁、张贵君）、第六章（李仁伟、陆景珊、王奕洁、常立军、孔增科、张贵君）、第七章（李晓波、李仁伟、郑春英、张贵君）、第八章（张贵君、李晓波、李仁伟、聂波）。李仁伟和王奕洁参加了统稿工作。

本书在编写过程中得到了化学工业出版社的大力支持，在此表示衷心地感谢。由于编者水平所限，错误和不完善之处难免，敬请广大读者批评指正。

《中药科学鉴定方法与技术丛书》编委会

2005 年 8 月于北京

目　录

第一章　概　　述

第一节　中药生物鉴定的概念及其发展历程

一、中药生物鉴定的基本概念

生物鉴定（bioassay）法又称“生物检定”或“生物测定法”，是利用中药或其所含的化学组分对生物体（organism）的作用强度，以及用生命信息物质（DNA、蛋白质等）特异性遗传标记特征和基因表达差异等来鉴别中药品质的一种方法。换言之，就是通过对中药生命信息物质和生物效应等的识别，以达到品质鉴定目的的一种方法。目前主要分为生物效应鉴定法和基因鉴定法两大类。

生物效应鉴定法是利用药物对于生物（整体或离体组织）所起的作用，测定药物生物活性（biological activity）强度或药理作用，以鉴别中药品质的方法。该方法以药理作用和分子生物学为基础，以生物统计学为工具，运用特定的实验方法和病理模型，通过比较被测物与相应的对照品在一定条件下产生特定生物反应的剂量比例，测出药物的活性作用强度。常用的方法有免疫鉴定法、电泳鉴定法、生物效价鉴定法、单纯指标鉴定法、细胞生物学鉴定法等。基因鉴定法包括DNA（deoxyribonucleic acid，脱氧核糖核酸）遗传标记鉴定法和mRNA（messenger ribonucleic acid，信使RNA）差异显示鉴定法等。

二、中药生物鉴定的发展历程

作为一种系统的中药鉴定方法学体系的提出，中药生物鉴定法之名始见于21世纪高等医药院校教材《中药鉴定学》。

中药生物鉴定法孕育在长期的中药鉴定学发展过程中并逐渐形成，它的出现弥补了中药理化鉴定方法的不足，为中药品质鉴定提供了有效的手段。生物鉴定法是在分子生物学、细胞生物学、免疫学、受体学和药效学等现代技术基础上延伸出来的新的方法学体系，归纳起来可分为以下几个阶段。

（一）萌芽阶段

本阶段是伴随边缘学科的发展而发展起来的。20世纪60年代亨尼希（Hennig）提出了生物学的分支系统学，强调以共同祖先亲缘关系的近度作为种群关系的标准，创立了祖征、衍征、外类群、近祖和近裔共性等概念和方法。

20世纪80年代分子生物学理论和技术迅速渗入生物分类学，形成了分子系统学（molecular systematics）。分子系统学的问世，把生物的形态学扩展到了生物信息学，生物的三级信息物质（DNA、RNA、蛋白质）成为了有价值的分类指标。三级信息物质是物种特征的根本所在，它可以反映生物遗传密码传递顺序。

生物分类学的发展引导了中药品质鉴定的现代化研究，展示了中药信息物质用于品质鉴定的广阔空间。中药绝大部分来自于生物，其优势品种（物种）经历了复杂的历史生态变迁过程。在长期的中药应用实践中，人们逐渐认识到：只有把握生物的信息特征，才能把中药品质鉴定研究提升到新的层次和水平。

（二）发展阶段

本阶段出现了现代生物技术用于中药鉴定的实例研究，并取得了显著的成绩。

1. 免疫技术的应用

自1971年Engvall等建立了检测可溶性物质的酶联免疫吸附测定法（ELISA）和1972年Rubenstein等建立了均相酶免疫测定（即酶放大免疫分析，EMIT）以来，酶联免疫检测方法进展很快，目前已成为一类较为成熟的方法。酶联免疫检测方法具有微量、特异性强、高效、经济、方便和安全等特点，广泛应用于生物学和医药学的许多领域，在理论研究和实际工作中都发挥了重要作用。

20世纪90年代出现了利用中药的蛋白质和多糖等进行免疫化学、血清学和酶免疫技术等专属性鉴定方法的研究。

在此期间，对植物类中药主要采用专属性强的生物初级或次级代谢产物与化学对照品比较测定，作为中药品质标准或指标性成分。但大量的研究结果表明，单一化学成分所表述的信息量有限，中药基原的不同亲缘种、亚种间常含相同成分；同一品种在环境因素作用下也可能含不同质和量的化学成分。动物类中药由于缺乏专属性的次级代谢产物，用理化鉴定方法进行有效地鉴定有一定的困难。

丁培贤等采用免疫化学的方法鉴别虎骨、豹骨。冯振波等利用虎的血清蛋白对家兔进行免疫，制备抗血清，使用抗虎血清等分别与虎骨、狮骨、豹骨、猞猁骨、原猫骨、牛骨、羊骨、猪骨、熊骨的骨质蛋白进行环状沉淀反应，结果均未出现交叉反应，证明该鉴定方法具有专属性。

日本学者使用家兔获得了高效价的抗牛黄、抗地龙的抗血清，并用其鉴定中成药，证实了这两种血清与存在于成药的抗原成分发生反应，既能用于定性也能用于定量。

吴谦等采用ELISA确证了长牡蛎特征蛋白抗原，制备免疫抗血清，对海王牡蛎胶囊中的原料药牡蛎成功地进行了鉴别和含量测定。该技术的缺点是实验周

期长，所需动物量大，特异性高的抗体不易制备；免疫血清存在交叉反应（属于多克隆抗体）；干燥中药各种蛋白的降解较难解决，导致了该技术在中药鉴定应用中的局限性。

亦有采用免疫印迹法（immuno blotting）鉴定的实例，该方法既可原位转印电泳区带、辅助确证品种特征抗原分布，也可以把供试品点样于硝酸纤维素膜上直接进行斑点酶联免疫吸附测定法（dot-ELISA）鉴定。

2. 电泳技术的应用

来自于生物的中药普遍含有受遗传基因控制的蛋白质或酶，利用蛋白质或酶分子的电泳谱带特征可达到鉴定的目的。

一般采用聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE），把中药所含的全蛋白分散开来，染色后就可看到不同的蛋白质谱带。通过分析谱带数目、宽窄、位置及染色程度等，可获得专属性的鉴定信息。

1981 年，王龙首次报告了采用电泳法鉴别虎骨的实例。随着大分子印迹技术、计算机技术的发展，蛋白质印迹技术大大地改善了电泳分析手段，电泳图谱也可用自动成像仪扫描，由计算机进行结果分析和统计学处理，使结果的准确性和客观性显著提高。

3. 同工酶分析技术的应用

在生物的不同个体、同一个体的不同组织，或生长发育的不同阶段，都可以检测到一系列功能相同、结构上略有差异的酶存在，这就是同工酶。同工酶的变异非常丰富，结构的差异直接来源于基因的差异，并能够稳定地遗传。因此，用它可以鉴别许多从外部形态上难以区分的遗传变异。另外，由于同工酶分析系统采用酶活性染色和电泳检测，非酶类成分不被显示，其电泳图谱往往比蛋白质电泳图谱清晰。

利用同工酶作为遗传标记进行某些中药和药用植物的鉴定是一种行之有效的方法。赵华英等对忍冬藤（*Lonicera japonica* Thunb.）、何首乌藤（*Polygonum multiflorum* Thunb.）、南蛇藤（*Celastrus orbiculatus* Thunb.）等 6 种藤茎类中药进行了过氧化物酶、酯酶和淀粉酶的同工酶电泳分析，其中过氧化物同工酶的谱带最清晰，其谱带数及迁移率各不相同，能显示种间的明显区别特征。张渝华等对紫堇属 8 种及 2 个变种进行了过氧化物同工酶酶谱分析，证明该属的药用植物种间差异明显。

为了防止酶失活，同工酶分析技术一般使用新鲜样品，取样必须是新陈代谢活跃的部位，分析条件比蛋白质要求高。这也限制了同工酶分析技术在干燥中药鉴定上的应用。另外，同一个体不同生长时间、不同药用部位、不同炮制方法和储藏条件，都可能造成同工酶的不同差异，所以，解决特异性和代表性是该方法的关键问题。

4. 细胞生物学技术的应用

细胞生物学技术主要用于药用植物的基原鉴定，一般采用染色体鉴别技术。染色体是遗传基因的载体，生物在一个种群的所有个体和同一个体的所有体细胞中染色体的形态、组型与带型都是一致而稳定的，具有一定的专属性。

杨蕾等对葱属（*Allium*）植物6个种11个居群的染色体的数目和核型进行了研究，发现了韭菜（*A. tuberosum*）的野生二倍体居群，为各供试品的种内群间关系和核型研究打下了基础。

景望春等对葱属宽叶组（*A. sect. anguinum*）的5个种及3个变种23个地方居群进行研究，发现总体上组内的核型表现出较大的相似性，但在种间和种内各居群间也存在一定差异，主要表现为有的种内存在染色体的倍性变化，染色体在种间和种内表现出一定的多态性。

染色体分析其取材一般均需新鲜组织，获得的鉴定特征信息如染色体数目和形态、相对长度、着丝点位置等较少，虽然核型分析可以反映出染色体的结构变化，但不能显示出个体基因的变化，因此对于多种近缘属的药用植物难以达到鉴定的目的。

虽然上述这些方法与传统的中药鉴定相比有一定的优越性，然而这些鉴定的依据几乎均为生物体的遗传表现型，它们不仅受到遗传因素的影响，而且与生长发育阶段、环境、加工炮制等有着密切的关系，具有较大的差异性。因此，上述鉴别技术难免存在主观性强、重复性和稳定性差的特点。

5. DNA分子标记技术的应用

20世纪90年代随着分子遗传学和基因工程技术的发展和广泛应用，利用现代生物学技术构建中药DNA指纹图成为可能。DNA是绝大多数生物遗传信息的载体，由于DNA指纹图具有高度种属和个体特异性，因而以其作为中药鉴别技术具有准确性和科学性等特点。在DNA分子水平上，限制性片段长度多态性（PFLP）、聚合酶链反应（PCR）已经逐渐成为中药基因多态性检测的常规技术，而在其基础上建立的随机扩增多态性DNA指纹分析（RAPD）、任意引物PCR反应技术（AP-PCR）和限制性内切酶酶切片段长度多态性分析则是发展起来的基因鉴定行之有效的方法。

1993年荷兰Keggene公司Zabeau和Vos等结合RFLP和PCR技术的优点，发明了扩增片段长度多态性（AFLP）标记方法，为不同来源基因组分析提供了技术支持，曾在玉米、西红柿等农作物的改良研究上得到了较好的应用，对中药良种选育、道地性鉴定具有重要意义。邵鹏柱等报道了用AFLP法鉴定人参、西洋参不同产地遗传差异的特征。王亚明等人成功地从保存9年以上的中药龟甲和鳖甲中提取出了DNA，并用细胞色素b基因片段的通用引物对通过PCR扩增到了长约500bp的DNA片段，提供PCR技术鉴定中药的基础资料。

1994 年香港学者采用 AP-PCR 指纹图技术对人参和西洋参进行了基原鉴别。之后便出现了定量 PCR（Q PCR system）技术，定量 PCR 一般采用已知模板同步内标，通过标记物探针杂交绘制标准曲线，使用 Q PCR 仪定量复制，只须简单运算即可知原始拷贝数。

20 世纪 80 年代初 Botsteh 首先提出利用 RFLP 作为标记构建遗传图谱，直到 1987 年 Donis Keller 等人才构建出第一个人的 RFLP 图谱。此后，人们便开展起分子水平上 DNA 多态性的应用研究。水上员等对日本 8 个产地的柴胡采用水稻 rDNA 作为探针，用限制性核酸内切酶 *Dra* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ、*Taq* Ⅰ 酶解进行 RFLP 分析，结果发现不同地理品系的 RFLP 图谱明显不同。他们还采用 *Dra* Ⅰ、*Kpn* Ⅰ、*Eco* RⅤ、*Sac* Ⅰ 对中国和日本野生的苍术类共 19 个地理品系进行酶切，结果显示，日本所产的茅苍术与中国所产的茅苍术基本一致，并能明显区分茅苍术、白术及关苍术。

Yamazaki 等采用 RFLP 方法分析羽扇豆属（*Lupinus*）5 种药用植物的亲缘关系及与其双稠哌啶类生物碱的相关性，结果表明 RFLP 可以区别这些羽扇豆属药用植物。

Liston 应用 PCR 将黄芪属（*Astragalus*）14 个近缘种叶绿体基因组一段约 4.1kb 的片段扩增出来，然后用 23 种不同的限制性酶酶解 PCR 产物，发现了 37 个突变点和 1 个 10bp 的长度变异。丁士友等在此基础上，用 PCR 将黄芪亚族 7 属 9 种及甘草亚族 1 属 4 种植物叶绿体基因组中 *ndhF* 和 *psbA* 基因中一段约 3.1kb 的 DNA 扩增出来并进行酶切，为黄芪亚族的分子分类打下了良好的基础。何兴金等用 PCR 对代表中国全部 9 组 18 种葱属植物进行扩增，得到了叶绿体的 2520bp 的 *trnK*（TRNA-Lys）和 1230bp 的 *rpcL 16*（ribosomal protein L 16）2 条基因，又用 26 种内切酶进行酶解，将所得片段与以往结果对比，从分子水平上探讨了葱属植物的系统发育。

Mizukami 等采用 *Hind*Ⅲ 酶解 5S rRNA 扩增的基因片段，鉴别了当归、柴胡、北沙参等中药。山崎美保等应用 PCR-RFLP 鉴定了花鹿茸和马鹿茸。

1990 年 Williams 和 Welsh 几乎同时采用 PCR 技术建立了 RAPD 检测方法。山崎等采用 RAPD 和 RFLP 两种分子标记方法研究了 4 种甘草属植物遗传关系，结果发现富含甘草甜素（glycyrrhizin）的品种光果甘草和甘草之间遗传关系非常相近，这两者与不含甘草甜素或含量极低的刺甘草和刺果甘草的遗传关系较远，与植物分类学研究的相吻合。Nabai 等采用 RAPD 标记方法对淫羊藿属 8 种植物进行了鉴定。Kohjyouma 等对日本野生或栽培的茅苍术及其变种、北苍术、关苍术和白术采用 RAPD 分析它们的挥发油组成和亲缘关系，结果表明苍术酮（atractylon）不仅在关苍术和白术中存在，而且在茅苍术及其变种中也有发现。曹晖等利用 AP-PCR 和 RAPD 分子标记技术对蒲公英及其 6 种土公英混淆品进

行了 DNA 指纹鉴别研究，结果显示它们的 DNA 指纹图谱存在明显的差异，利用这种差异可从分子水平上鉴别蒲公英及其相似品。

Mizukanu 等从当归、三岛柴胡、珊瑚菜的鲜茎中提取 DNA，用 5S rRNA 的通用引物对进行扩增，得到了 300bp 片段的产物，经测序后发现，2 个栽培品系间的 5S rRNA 基因片段上第 202 号、第 207 号、第 254 号核苷酸序列不同，而中药当归的扩增产物与日本当归完全一致，即可用 5S rRNA 分析中药当归的基原。

葛颂等采用 PCR 直接测序法，对沙参属全部 2 组 7 亚组的 10 个种及作为外类群的风铃草属 2 个种的核糖体 DNA ITS（内转录间隔区）片段进行了序列分析。结果表明，在沙参属中 ITS 片段在长度、GC 含量和位点变异上均比较一致；沙参属种间在 ITS 片段上的分化很小（0～3.9%），沙参属与风铃草属间的分化却很高（17.8%～19.2%）。

Fushimi 等通过变异等位基因扩增技术（MASA）对 *mat K* 基因片段测序发现，人参、西洋参与竹节参间的 *mat K* 基因片段上第 102 号核苷酸序列不同。Wen 和 Zimmer 对人参属 12 种植物的 ITS 区和 5.8S rRNA 基因进行了序列分析，结果表明：在美洲东北部的 2 个种西洋参与三叶人参（*P. trifolim* L.），西洋参与东亚种人参、竹节参、三七具有更近的亲缘关系，而且 ITS 序列证明人参、西洋参和三七不是一个单系群（monophyly）。

王建云等从鸡内金中提取 DNA，采用 *cyt-b* 基因特异扩增，得到 1 个长度约为 300bp 的片段，DNA 测序得到约 143 个碱基的序列片段，其中 36 个碱基的差异可以明确区分鸡内金和鸭内金。并用 *cyt-b* 基因中的 L14841 和 H15149 引物对鹿鞭进行了鉴定。吴平等在鳖甲和龟甲的研究中，用线粒体 12S rRNA 的引物进行扩增，鉴定了不同的品种。

20 世纪 90 年代后期李萍等将 DNA 分子遗传标记技术在中药鉴定中的应用以概述的形式载入全国高等医药院校的教材《生药学》中。

（三）完善和成熟阶段

本阶段出现了中药生物鉴定方法的理论体系，并作为中药鉴定的五大方法之一。21 世纪初期生物技术在中药鉴定中的应用得到了快速的发展，在通过对应用成果的系统整理的前提下，生物鉴定技术在中药鉴定中的应用得到了科学理论的提升和方法学的延伸，张贵君等提出了中药生物鉴定法的理论、概念和方法学体系，归纳为生物效应鉴定法和基因鉴定法两大类，作为一种独立的中药鉴定方法学成功地载入了 21 世纪全国高等医药院校教材《中药鉴定学》中，并佐以人参（植物药）、鹿茸（动物药）和注射用双黄连（中成药）等鉴定实例。

中药生物鉴定法作为中药品质鉴定的有效方法，是中药现代化的产物，方兴未艾，具有广阔的发展空间和应用前景。

第二节 中药生物鉴定的常用方法

一、免疫鉴定法

免疫鉴定法是利用中药含有的特异蛋白为抗原制备的特异抗体，与供试品中特异抗原结合产生沉淀反应的一种方法。它是通过制备特异抗原试剂，采用免疫电泳（immuno-electrophoresis）或琼脂免疫扩散等方法达到鉴定目的的。本方法具有专属性强的特点，适用于中药的品质鉴别。它涉及的相关技术主要有血清学方法、药理学方法、受体学方法、免疫化学方法、酶联免疫法、免疫印迹法等。

其中利用中药含有多糖类、蛋白质等具有抗原决定簇的大分子，用它们制成特异性抗体（抗血清）进行中药鉴定，是一种具有高度选择性的血清学鉴定方法。血清学鉴定法可用于来源科以上到种以下各分类等级的药用动植物分类，也可以用于药用动植物的亲缘关系研究。血清学鉴定特征的研究对中药复方制剂的鉴定具有适用性和重要价值。

血清学鉴定法中比较重视免疫印迹法（immuno blotting）。该法既可原位转印电泳区带，协助确证中药特征抗原分布，也可把待鉴别供试品点在硝酸纤维素膜上，直接进行斑点酶联免疫吸附测定法（dot-ELISA）鉴别。

该方法的缺点是：实验周期长，所需动物量大，特异性高的抗体不易制备；免疫血清属于多克隆抗体，存在交叉反应，干燥中药各种蛋白的降解较难解决。

二、电泳鉴定法

电泳（elctrophoresis，EP）是一种分离和鉴定混合物中带电离子的技术，其原理是利用中药含有蛋白质带电荷的成分，在同一电场作用下，由于各组分所带电荷的性质、电荷数目以及分子质量不同，而泳动方向和速度不同，在一定时间内，各成分的泳动率不同，结合谱带数和染色不同达到鉴定的目的。本方法用于含有蛋白质、多肽和酶类等中药的鉴定，其特点是快速、准确、专属性强、灵敏度高、重现性好。鉴定对象多数为动物药类，植物药的果实和种子类、部分根及根茎类中药，以及含有上述成分的中成药。

常用的方法有 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电点聚焦凝胶电泳、不连续性聚丙烯酰胺凝胶电泳、醋酸纤维素薄膜电泳、区带毛细管电泳、胶束毛细管电泳等。其中聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）具有机械性能好、与被分离物质不起反应、对 pH 值和温度变化较稳定、重复性好、灵敏度高等优点。聚丙烯酰胺凝胶电泳是由丙烯酰胺和 N,N-亚甲基双丙烯酰胺在催化剂作用下聚合交联成三维网

状结构的凝胶，并以此为支持物的电泳技术。在电泳开始阶段，由于连续 pH 梯度作用，将样品压缩成 1 条狭窄的区带（浓缩效应），从而提高样品的分离效果。

三、生物效价鉴定法

生物效价鉴定（estimation of biological potency）就是测定药物对生物机体某方面作用的强度。如黄连、黄柏、黄芩等具清热功效中药的抑菌率或抗菌效价（titer）的测定，对洋地黄强心指标生物效价的测定等。生物效价鉴定法也叫生物检定或生物测定法，换言之，是利用生物体的反应来鉴定中药有效成分的含量或效价，测定药物的疗效和毒性（toxicity）的方法。

有些中药，如洋地黄及其制剂、铃兰毒苷及其注射液，到目前为止还没有找到一种比较合适的化学分析方法来确定它们的有效成分含量或效价。所以，就宜用生物效价鉴定法进行测定。生物效价鉴定法的原则是将供试品与对照品（包括中药，纯成分）在严格规定的条件下，比较它们对生物体所产生的反应强度，再计算出中药或其制剂的剂量标准。中药的效价通常以 1g 中药中所具有的“作用单位”数来表示。这种单位是指在一定条件下所表现一定生理作用的最小剂量。例如，《中华人民共和国药典》（2005 版）规定洋地黄制剂的质量标准：洋地黄叶（folium digitalis）要保证同样洋地黄制剂的各种商品的效价一致，而并不是为了使不同的精制强心苷效价相等。因为这种方法不能把它在肠内吸收的差别、作用的快慢以及效力的久暂等估计在内。此种生物效价鉴定法包括蛙法、猫法、豚鼠法及鸽法等。

四、单纯指标鉴定法

单纯指标鉴定法就是测定某药物或某类药物某一特性或某一药理作用的强弱。如对含皂苷类中药溶血指数的测定，如使用溶血法鉴定柴胡和大叶柴胡；对含苦味中药苦味指数的测定；对含蒽醌类大黄的泻下作用的测定；对青黛中靛玉红、两头尖中竹节香附素 A 的抗癌活性的测定；对黄芪中黄芪皂苷甲、三七中三七皂苷降血压和扩张血管作用的测定；对人参中人参多糖、刺五加根中刺五加多糖和红花多糖的免疫作用的测定；对三七抗凝血作用的测定等。

五、细胞生物学鉴定法

细胞生物学鉴定法主要是采用染色体（chromosome）的分类技术对中药进行鉴定。染色体是遗传基因的载体，中药某个特定种群的生物体细胞中染色体的形态、组型、带型是稳定不变的，代表着该种群的基本遗传特征，根据该特征即可以鉴定中药的品种。本法根据染色体的排列，制成核型模式图；或用“不对称核型分类”标准确定其核型，并与染色体的背景资料比较，达到鉴定的目的。由

于染色体形态只能在细胞分裂的中、后期观察，故本方法只适用于果实和种子类中药的鉴定，在中药基原鉴定中广泛应用。

染色体的形态和数目可作为生物体的一个本质特征，但这一特征不是绝对不变的，在条件发生变化时，染色体的数目会发生改变。就是在正常情况下，一个生物体的染色体数目也可能有变化。所以染色体计数常要选取观察 50～100 个细胞，求得各种染色体数目所占的百分比，才能得出正确的结论，且计数工作有一定的难度。染色体的特征量不多是其缺点之一。该方法用于多种近缘属来源的中药鉴别有一定难度。

此外，来源于生物的中药含有受遗传基因控制的蛋白质或酶分子，利用蛋白质或酶分子的电泳谱带特征，提取不同中药的鉴别特征带，进行品种鉴定，并可根据其谱带特征对中药的产地、栽培类型、炮制方法、储藏条件和时间等影响品质的因素进行分析。若供鉴定的样品能够反映该品种的多样性，即多数基因所表达的蛋白质都能在区带中表达。一般是采用聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）将中药所含的全蛋白分散开来，染色后就可看到不同的蛋白质谱带，通过分析谱带数目、宽窄、位置及染色程度等，可获得相当多的信息，从而达到鉴定的目的。

六、DNA 遗传标记鉴定法

DNA 分子是由 G、A、C、T4 种碱基（base pairs，bp）构成，为双螺旋结构的长链分子，生物体特定的遗传信息便包含在特定的碱基排列序列中，遗传上的差异便表现在 4 种碱基排列顺序的变化之中，这就是生物的遗传多样性。比较物种间 DNA 分子的遗传多样性的差异来鉴别物种就是 DNA 分子遗传标记鉴别。在 DNA 分子上，有编码与物种密切相关的基因区域、不十分密切相关的基因区域和非编码基因区域。这些基因区域在生物进化过程中所受的压力不同，前者所受选择压力大，表现出高度的保守性；后者所受选择压力小，表现出较大的差异性。正是这种压力的不同，使得 DNA 分子的不同区域有不同程度的遗传多样性。因此，可以选择适当的 DNA 分子遗传标记方法，在科、属、种、亚种、居群和个体上对中药进行鉴别特征研究。

动植物类中药材大多数是死亡的干燥生物体或生物的组织器官、分泌物等，而在生物体死亡的过程中，细胞会产生核酸酶大量降解 DNA，这就给中药材的 DNA 分析带来了困难。近年来随着分子生物学技术的飞速发展，特别是微量 DNA 提取技术和聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）技术的发展，使从中药中提取微量的 DNA 进行分析成为现实，也为采用 DNA 技术对中药材种质资源进行鉴定奠定了基础。

DNA 遗传标记鉴定法是根据不同生物类中药个体遗传物质 DNA 的差异来鉴定中药的一种方法。动植物的外部形态和所含化学成分的多少往往随生态环境

的改变而发生变化。中药（特别是动植物中药）的形状随入药部位、加工方法的变化而变化，这些变化常给中药的鉴定带来困难。众所周知，动植物依靠细胞分裂繁衍后代，在这种繁殖过程中亲代将保持种群外部形态、组织功能、生理和生化特征等遗传信息遗传给子代，即在细胞分裂的过程中遗传物质由亲代遗传给子代。大量的研究证明，遗传物质存在于细胞核中，细胞核中的染色体是遗传基因的载体。染色体的数目和形态是动物和植物体内比较稳定的重要特征。在由DNA、RNA和蛋白质组成的染色体中，DNA是绝大多数生物（除少数病毒外）的遗传物质。同种生物的细胞中具相同的DNA，不同种生物的细胞中具不同的DNA。采用细胞与分子遗传学技术鉴定中药就是以上述理论为依据，借助相应的技术达到鉴定的目的。该方法分为细胞遗传学技术和分子遗传学技术两大类。例如采用分子遗传学技术鉴定鸡内金，即利用微量DNA提取技术，从鸡内金（鸡 *Gallus gallus domesticus* Brisson 的干燥沙囊内壁）中提取DNA，以线粒体DNA细胞色素b（mtDNA *cyt-b*）通用引物中的L14 841和H15 149为引物，进行特异性扩增DNA片段的PCR反应，并测定其DNA143碱基序列，能区分鸡内金和鸭内金。

DNA遗传标记鉴定中药的主要方法有：限制性片段长度多态性分析（restriction fragment length polymorphism，RFLP），扩增片段长度多态性（amplified fragment length polymorphism，AFLP）分析，PCR标记，PCR-RFLP法，随机扩增多态性DNA（random amplified polymorphism DNA，RAPD）指纹分析，DNA序列测定法，任意引物PCR（arbitrarily primed PCR，AP-PCR）反应技术，PCR扩增特定片段的限制性位点分析等方法。

1. RFLP法

PFLP是DNA片段诊断技术，这一技术的基础是通过核酸的限制性酶切片段长度多态性来揭示DNA碱基序列组成的不同，因而又称为限制性酶切片段长度多态性技术。自从Botsteh提出利用RFLP作为标记构建遗传图谱之后，人们便开展了分子水平上DNA多态性的应用研究。RFLP标记呈孟德尔遗传模式，为一种共显性标记，能区分纯合基因和杂合基因型，因此特别适用于构建基因连锁图，是研究药用生物居群内和居群间遗传变异以及亲缘关系强有力的工具。在中药鉴定中，本方法主要用于中药的基原、地理品系或栽培品系等质量评价方面的研究。

尽管RFLP法具有共显性的特点，实验结果稳定可靠，但也有其缺点，即：费时；每次实验检测的位点较少；需用放射性同位素或非放射性物质标记探针；探针的种属特异性较强。本方法适用于新鲜中药的鉴别。

2. AFLP法

AFLP原理非常简单，引物设计十分巧妙。它结合了RFLP和PCR技术的

优点，具有 RFLP 的可靠性和 PCR 的高效性。

其基本原理是对基因组 DNA 酶切片段的选择性扩增，使用双链人工接头（artificial adapter）与基因组 DNA 的酶切片段相连接作为扩增反应的模板，接头与接头相邻的酶切片段的几个碱基序列作为引物的结合位点。利用 AFLP 技术在不需要事先知道 DNA 序列信息的情况下可以同时进行多数 DNA 酶切片段的 PCR 扩增，通常 1 次普通的 AFLP 实验可获得 50～100 条谱带。

该技术对模板的完整性和纯度要求较高，对中药的优良品种选育、道地性鉴定具有积极的意义。

3. PCR 标记

PCR 标记又称无细胞分子克隆技术，是模拟自然 DNA 复制过程的体外酶促合成特异性核酸片段技术。它以待扩增的 2 条 DNA 链为模板，由 1 对人工合成的寡核苷酸引物介导，通过 DNA 聚合酶促反应，在体外进行特异 DNA 序列扩增。PCR 过程在 2h 内经过变性、复性、延伸约 30 个循环就可将痕量的靶 DNA 扩增数百万倍，具有操作简单、快速、特异、灵敏的特点。

PCR 技术能对微量或高度降解的 DNA 样品进行分析，尤其适用干燥中药的 DNA 鉴别。PCR 技术要求获得该品种特异的稳定 DNA 序列片段，合成的 PCR 引物必须是待测中药居群 DNA 高度保守区段序列。若从已知特征氨基酸-遗传密码顺序去寻找引物，可将蛋白质与核酸分析相结合。

4. PCR-RFLP 法

该方法是 RFLP 和 PCR 技术相结合产生的技术，它是对 PCR 扩增的 DNA 片段进行限制性酶切位点分析。相对于在杂交基础上的 RFLP 而言简便而高效，只需纳克级水平的 DNA 作为模板扩增，因而只需毫克级的材料提取总 DNA 用，即能获得丰富的基因多态信息。

PCR-RFLP 法的缺点是由于要进行酶切，必须知道模板的序列，而且对模板的纯度要求较高，否则酶切效果不理想。另外，在中药的鉴定研究中，在不知道模板序列的情况下，可用随机酶切法解决部分鉴定的问题。

5. RAPD 法

RAPD 技术以 1 个 10 碱基的任意序列的寡核苷酸片段为引物对未知序列的基因组 DNA 进行随机的 PCR 扩增，这种被 DNA 聚合酶调节的扩增是一个复杂的、动态的化学反应系列。在这些反应中，引物将同源序列从非同源的竞争位点中识别出来并确定以后的扩增效率，在模板、扩增产物、酶、引物与 dNTP 浓度之间的平衡，随每个温度周期而变，不同种类的分子彼此相互作用，其结果是合成了 PCR 扩增产物。

RAPD 是 PCR 技术的延伸，在具体操作中只需设计长度为 9～12bp 的任意引物，每一个 RAPD 反应则加入相关随机引物，对目标基因进行扩增，扩增产

物经过聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶电泳分离，经溴化乙锭（EB）染色来检测扩增产物 DNA 片段的多态性，这些多态性反映了基因组相应区域的 DNA 多态性。

RAPD 所用的一系列引物的 DNA 序列各不相同，但对于任一特定的引物，它同基因组 DNA 序列有其特定的结合位点。这些特定的结合位点在基因组某些区域内的分布如符合 PCR 扩增反应的条件，即引物在模板的 2 条链上有互补位置，且引物 3′端相距在一定长度范围内，就可扩增出 DNA 片段。如果基因组在这些区域发生变异导致特定结合位点分布发生相应的变化，会使 PCR 产物增加、减少或发生分子量的变化，从而可检测其基因组 DNA 的多态性。

RAPD 法的特点是：引物不严格，具有广泛性、通用性，所合成的一套引物可以用于各类样品的分析，适合于大规模生产和商品化，降低费用；操作简便，可直接对基因组进行连锁标记作图，避开了 RFLP 和重复序列基因组作图必作的 DNA 标记克隆——多态性筛选和测序分析；RAPD 标记相当于靶序列位点（sequence-tagged site），可以快速定向寻找与所定位连锁的 DNA 标记，从而快速完成此基因定位；使用样品量少，且不需使用同位素，减少了对工作人员潜在的危害；可在生物周期的任何阶段进行检测。

一般认为 RAPD 法主要用于中药种内不同居群间亲缘关系的研究，但也有一定的局限性，因为不同种或属的扩增产物即使有相同的迁移率，但其碱基组成（序列）不一定一致，亲缘关系越远，其碱基组成（序列）差异就越大。中药的品种复杂，如果仅用 1～2 个引物进行鉴定缺少可信性。因此，RAPD 法用于来源于同属中药的鉴定比较可靠。

RAPD 法所需样品基因组 DNA 的量仅为 10ng，是 AP-PCR 标记的 1/10 左右。它可以在不知道特异 DNA 序列的情况下检测 DNA 的多态性，尤其在目前绝大多数动植物中药 DNA 序列尚不清楚的情况下，RAPD 分子标记比其他 PCR 标记具有更广阔的应用范围。

6. DNA 序列（DNA sequencing）测定法

由于中药的加工和储藏过程不利于 DNA 的保存，采用 RFLP 和 DNA 指纹图谱进行中药鉴定比较困难，而 DNA 序列分析的发明使 DNA 分子鉴定技术前进了一大步。

经典的 DNA 序列分析基本上以分子克隆为基础，制备测序模板费时费力，由于克隆的是单个分子，既难应用于大量的基因研究，又不适用于杂合等位基因的研究分析。而基于 PCR 的 DNA 直接测序技术是以 PCR 扩增引物作为测序引物，这极大地提高了 DNA 序列分析的效率。

目前用于 DNA 测序的基因主要有：叶绿体基因组 *rbcL*、*matK*、*rpoC*，核基因组的 rRNA、ITS 等（植物类），线粒体基因组的 *cyt-b*（动物类）。*rbcL* 基因分辨率高，变异较均一分布，进化速率差异大，一般用于科级以上药用生物分

类群的研究。

matK 位于 *trnK* 基因的内含子中，长约 1500 碱基，编码成熟酶并参与 RNA 转录体中Ⅱ型内含子的剪切，是叶绿体基因组蛋白编码基因中进化速率最快的基因之一，变异较均一，一般用于中药品种一级分类群亲缘关系的研究。

rRNA 是编码核糖体 DNA 的基因，在植物中以重复连续排列方式存在，包含进化速率不等的编码区、非编码转录区和转录区，可选择较保守的片段如 18S、5S 的 rRNA 进行各种亲缘关系的研究。ITS（内转录间隔区）在核糖体 DNA 中位于 18S 与 26S 基因之间。由 5.8S 基因分为 2 段 ITS_1 和 ITS_2，由于在被子植物中 ITS 存在于高重复的核糖体 DNA 中，进化速率快且片段长度仅 700bp，加上协同进化使该片段在基因组不同重复单元间非常一致，等位基因间甚至 ITS 的不同拷贝之间都可能存在序列上的差异，所以一般用于中药品种以下一级分类群亲缘关系研究。此外，核基因是双亲遗传，不同于叶绿体基因上单亲遗传，能反映真正的进化过程，这使得核基因在中药品质鉴定中占有较重要的地位。

在实际工作中，如能进行中药全序列的测定，则将为 PCR 引物的设计、目的基因的扩增、序列的遗传进化分析、遗传育种等各方面提供了有利的前提条件，这将极大地提高鉴定效率及结果的可靠性。

上述几种用于中药鉴定的遗传标记方法，各有其特点、适用范围和局限性，在实际工作中常需要多种方法综合应用才能达到鉴定的目的。

七、mRNA 差异显示鉴定法

mRNA 差异显示鉴定法是利用中药的不同组织或细胞在基因表达（geneex-pression）上的差异进行鉴定的一种方法。它通过将总 RNA 反转录成单链cDNA（complementary DNA），然后进行 PCR 扩增反应，分离出不同分子大小的 DNA，挑选出有差异的表达基因进行序列分析。既可以制备探针用于稳定灵敏的检测实验，也可以制备其蛋白产物及其抗体进行免疫检测。采用该技术，可以提炼出栽培和野生、道地和普通中药等之间的特征，可望广泛用于中药的品质鉴定。

（张贵君）

第二章　免疫鉴定法

第一节　概　　述

免疫鉴定法是利用中药含有的特异蛋白为抗原制备的特异抗体，与供试品中特异抗原结合产生沉淀反应的一种方法。它是通过制备特异抗原试剂，采用免疫电泳（immunoelectrophoresis）或琼脂免疫扩散等方法达到鉴定目的的。

1950年美国免疫学家Pressmen和Eisen成功地使用了放射性碘标记抗原来研究抗原-抗体免疫反应。1953～1956年Berson和Yalow进行了应用放射碘标记蛋白质代谢追踪研究，发现非标记抗原能竞争抑制标记抗原和抗体的结合，并可从竞争能力的大小测定未知抗原的量，从而创建了放射免疫分析（RIA）法。在放射免疫分析的基础上，各种结合剂和标记物的分析技术得到了进一步发展，相继出现了酶免疫分析、荧光分析等方法。1968年Oliver成功地将地高辛与牛血清白蛋白结合，使无免疫原性的小分子药物成为人工抗原，在免疫动物中成功地得到了抗地高辛的抗体，开辟了放射免疫分析药物的方法。

免疫分析技术作为药物分析的方法，尤其是检测药物中的微量组分，具有灵敏度高（皮克级水平）、操作简便、样品用量少、可批量测定等优点。中药免疫鉴定是基于中药的组分与抗体免疫反应的特异性，以及标记抗原和非标记抗原对特异性抗体的竞争性反应原理，对于准确地鉴别中药品质具有十分重要的意义。

一、基础理论

免疫分析方法可根据不同的标记方法和标记物分类。例如，放射免疫分析是用放射性同位素标记抗原，通过测定结合的或未结合的标记抗原放射性来指示反应的情况；酶免疫分析是用不同的酶来标记抗原或抗体，以测定酶的活性来显示标记抗原抗体结合的情况；荧光免疫分析是以能产生荧光或猝灭荧光的物质作为标记物，以荧光强度的变化来显示标记抗原抗体结合的情况。

实质上，免疫反应是特异性抗体与抗原的结合反应，抗原只有与相应的特异抗体才能发生抗原抗体反应，形成抗原-抗体复合物，保证了免疫分析的专属性。抗原与抗体的结合反应结果往往需要通过向反应系统中加入标记物来显示。由于抗原与抗体结合时具有专属性和可饱和性，所以可以利用被测药物（未标记抗原）与标记药物（标记抗原）之间竞争性与抗体结合原理，建立药物浓度响应值

（如 RIA 中的放射强度）之间的函数关系，从而对生物样品中的药物进行定量分析。

免疫分析系统通常由未标记药物（抗原 Ag）、标记药物（标记抗原 Ag^*）和抗体 3 个部分组成，在一平衡的免疫反应体系内，抗原、抗体的反应符合质量作用定律。因此，当一定特异性抗体（Ab）存在时，未标记抗原（Ag）与已标记抗原（Ag^*）竞争性地和有限量的特异性抗体结合，形成标记抗原-抗体复合物（Ag^*-Ab）和未标记抗原-抗体复合物（Ag-Ab）。如下所示：

$$\left.\begin{array}{l} Ag^* \\ Ag \end{array}\right\} + Ab = \left\{\begin{array}{l} Ag^*\text{-}Ab \\ Ag\text{-}Ab \end{array}\right.$$

上式所示现象在免疫学中称为竞争抑制作用，即当特异性抗体的量一定时，随着体系中未标记抗原的量增多，则标记抗原-抗体复合物的形成就会受到抑制而减少，而且其减少的程度与未标记抗原的量有关，这就是免疫分析的定量基础。

二、抗原

抗原（antigen）是指能引起免疫反应的物质。机体接受外源性或内源性抗原刺激后产生的免疫反应，包括抗体形成及对淋巴细胞的致敏并释放出生物活性介质参与细胞免疫反应。

1. 抗原的基本性质

抗原一般具有两种性质，一是免疫原性，二是反应原性。免疫原性是指抗原进入机体能激发免疫系统产生体液免疫和细胞免疫反应的能力。反应原性是指能与抗体或致敏淋巴细胞发生特异性反应的能力。

当抗原同时具备免疫原性与反应原性时，称为完全抗原。例如大多数的异种蛋白与个别大分子的多糖都是完全抗原。医学上的病原微生物，如细菌及其毒素、病毒、立克次体、螺旋体、原虫等也都是完全抗原，而且是抗原性很强的抗原。仅有反应原性而缺乏免疫原性或免疫原性很不完善的物质，称为不完全抗原或半抗原，例如大多数的多糖、类脂等成分。这些物质不能单独激发机体的免疫反应，但若与机体的蛋白质载体结合后即具有抗原性。

2. 影响抗原性的因素

（1）种属　机体在发育过程中已逐渐建立起“识别自己，排斥异己”的免疫系统。种属相距愈远的抗原物质，使机体产生免疫反应的能力愈强，例如马血清对人体来说是异种物质，因为它的化学组成和结构与人的血清不同，因此具有较强的抗原性。不同个体的同种组织或细胞也具有不同的抗原性，一个个体的组织或细胞对另一个体可引起免疫反应，例如人类红细胞有不同的血型抗原，白细胞也有不同的人白细胞抗原（HLA）。

（2）抗原的分子大小　相对分子质量小于5000～10000的物质，一般说无免疫原性，相对分子质量大于10000的物质是良好的抗原。由于相对分子质量较大，分子表面有较多的反应基团，在体内存留时间较长，能与机体免疫系统充分地相互作用，故能产生免疫反应。此外，抗原性与物质的化学组成也有关，有些低相对分子质量物质，如相对分子质量只有5734的胰岛素，具有抗原性，而相对分子质量超过10000的右旋糖却无抗原性。

（3）抗原的物理性状　分子的物理性状对抗原性影响很大，例如蛋白质、核酸和人工合成的抗原，在聚集状态或非聚集状态具有不同的免疫原性。例如聚集状态的牛型丙种球蛋白，对小鼠是强免疫原，但经过超速离心，呈非聚集状态，则不能诱导免疫反应。

（4）抗原决定簇　抗原分子表面具有免疫活性的化学基团，称为抗原决定簇。抗原决定簇才可以引起特异性抗体的形成，在整个大分子抗原中只有少数化学基团对抗原特异性起决定作用，例如烟草花叶病毒的外壳，由2000多个蛋白质亚单位所组成，每个亚单位相对分子质量为16500，由156个氨基酸的肽链构成，而抗原决定簇仅位于这个肽链的108～112氨基酸之间。抗原种类不同，其分子的决定簇数目也不同，抗原相对分子质量愈大，所含的决定簇数目也愈多。

3. 药物分子的抗原性

大多数药物的成分相对分子质量较小，通常为半抗原。但一些大分子成分如蛋白质、多肽类、激素类等则有一定的抗原性。近年来研究发现，一些小分子药物在特定条件下，如和弗氏完全佐剂混合免疫动物，可使实验动物产生免疫应答，但通常比较弱。所以，在药物免疫分析中，通常先将药物分子（化学成分）与载体蛋白结合，以加强药物分子的免疫应答反应，从而得到更多的特异性抗体；然后再利用药物分子的半抗原性，通过药物及其产生的特异性抗体的相互作用来对药物分子进行分析。

4. 半抗原的制备

药物分子由于其相对分子质量较小，一般免疫原性较弱，通常被认为是半抗原。为了得到高效价的抗血清，通常要将其合成为合成抗原。

（1）常见的半抗原种类及性质　属于半抗原的物质是低相对分子质量的化学物质，如多糖、多肽、甾体激素、脂肪胺、类脂质、核苷、某些药物等。这些小分子物质并不是免疫原，只有把这些半抗原和载体结合后才具有免疫原性，刺激机体产生抗体或致敏淋巴细胞。这些用于偶联半抗原的蛋白质称为载体。半抗原与载体的相互作用的关系表明，抗半抗原决定簇抗体的形成要求载体分子有一定的结构。如将半抗原二硝基苯酚（DNP）偶联到一个没有免疫原性载体上时，动物不产生抗DNP抗体；但将它偶联到一个有免疫原性载体上时，就产生免疫反应。研究表明，对载体和半抗原决定簇产生反应的淋巴细胞是不同的，为了产

生抗半抗原的抗体，这两类反应都是必需的。

（2）载体的种类和常见载体的性质　载体有蛋白质类、多肽聚合物、大分子聚合物和某些颗粒等。蛋白质是一类结构复杂的高分子化合物，是一种良好的载体。常用的有人血清白蛋白、牛血清白蛋白、兔血清白蛋白、牛甲状腺蛋白等。以牛血清白蛋白最为常用。多肽是人工合成的多肽聚合物。常见的有多聚赖氨酸（poly-lysine），相对分子质量可达十几万到几十万，是良好的载体。

（3）半抗原与载体连接方法　带有游离氨基或游离羧基以及2种基因都有的半抗原，可直接与载体连接。不带游离氨基或游离羧基的半抗原，须经过适当的改造，使其转变为带有游离氨基或游离羧基的衍生物，才能与载体连接。半抗原与载体的连接通常用物理和化学方法进行。物理吸附的载体有羧甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮（PVP）、葡萄糖硫酸钠等。它们借电荷和微孔吸附半抗原。化学法是利用某些功能基团把半抗原连接到载体上，这些载体包括血清白蛋白、甲状腺球蛋白、血蓝蛋白、卵蛋白和人工合成的多聚赖氨酸。

（4）合成短肽免疫原的制备　在天然抗原-载体交联制备合成短肽的抗体中，关键是选择合适的肽段。通常选择对应于蛋白质氨基或羧基端10～15个氨基酸短肽，通过化学法交联到载体蛋白，也可根据亲水性分析或蛋白质二级结构计算出肽链内部的抗原位点顺序。选择蛋白质的氨基或羧基端是因为蛋白质末端容易修饰，而且可用戊二醛交联到载体蛋白。羧基端肽通过氨基可直接偶联到载体。但该法要排除肽端内碱性氨基酸存在。如羧基端的顺序为：

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
S	Y	G	K	N	Q	A	E	K	Q

由于第9位是赖氨酸（K），故不能用戊二醛偶联。在这种情况下，应合成为：

−1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
C	S	Y	G	R	N	G	A	E	K	Q

即插入一个半胱氨酸，以提供一个连接头，用马来酰亚胺羟基丁二酰胺酯将肽与载体蛋白偶联，半胱氨酸残基位于肽与载体之间，减小载体对肽段的干扰。

三、抗体

抗体（antibody）是指机体经抗原刺激后，由免疫活性细胞产生的一组免疫球蛋白，系B淋巴细胞的产物。B淋巴细胞受抗原刺激后，引起一系列细胞形态与生化特性的变化，即B淋巴细胞转化为淋巴母细胞并增生繁殖，最后演化为浆细胞，并合成免疫球蛋白。免疫球蛋白由两条相同的重链和两条相同的轻链组成，是一组含糖的蛋白质，每一种球蛋白称为类（class），每类又由于抗原性构差异，再分为亚类（subclass），例如IgG亚类IgG_1、IgG_2、IgG_3、IgG_4，而

IgA 与 IgM 也各有两个亚类。

1. 抗体的制备

简单地说，抗原免疫动物即可获得抗体。免疫分析中常用的抗体有抗血清（多克隆抗体）和单克隆抗体两类，抗血清可由抗原直接免疫获得；单克隆抗体是将免疫过的小鼠脾细胞与体外培养的骨髓瘤细胞经细胞融合技术产生杂交瘤细胞，再筛选得到。

（1）抗血清　人工制备的药物-载体蛋白结合物（完全抗原）并不能直接用于免疫动物来获得抗体，在免疫动物之前，先将定量的药物-载体蛋白结合物用生理盐水溶解（作为水相）；然后加入弗氏完全佐剂混合，形成稳定的油包水乳剂，最后免疫动物。弗氏完全佐剂（Freund's complete adjuvant）是由矿物油（液体石蜡）、乳化剂（羊毛脂）和死的分枝杆菌（结核杆菌、卡介苗或百日咳杆菌）等组成。佐剂的作用可能是使存在于水相中的药物-载体蛋白结合物被油层包裹，由乳剂储存库中缓慢释放，因此可在注射部位停留较长时间，作为免疫原能较长时间发挥作用；佐剂本身也可能刺激机体产生抗体，同时保护不稳定抗原，以利于衰期短、容易降解物质的免疫。

免疫动物可采用羊、兔或豚鼠，在其背部、腹部皮下、皮内注射，也可采取股淋巴结直接注射等。当动物血液内的抗体达到一定含量后，及时采血，分取血清（或血浆）。因一般不将抗体从血清分离而直接应用血清，故常称为抗血清。

（2）单克隆抗体　单克隆抗体是建立在经细胞融合而获得的杂交瘤细胞的基础之上的一种化学结构完全相同的特异性均质抗体，它产生的交叉免疫程度很低。而多克隆抗体往往随免疫动物、采血时间等的不同而不同，所以多克隆抗体是变化的、非均质性的混合抗体，不仅与同一药物的结合会发生变化，而且易受结构相近的其他药物交叉免疫干扰，而单克隆抗体的交叉免疫则大大减少。最早制得单克隆抗体的方法是用绵羊红细胞作为抗原免疫小鼠，获得具免疫能力的脾细胞，然后将脾细胞与另一种小鼠骨髓瘤细胞融合，得到杂交瘤细胞。这种杂交瘤细胞通过体外培养、大量复制，可生产出特异性的、结构相同的均质抗体——单克隆抗体。根据以上原理，首先人工合成药物-载体完全抗原，并免疫动物（如小鼠）获得具免疫能力的脾细胞，再将脾细胞与在体外具有不断繁殖能力的另一种小鼠的骨髓瘤细胞融合成为杂交瘤细胞，然后培养繁殖杂交瘤细胞，再经过反复的免疫学检验和单个细胞培养，获得既能产生所需抗体，又能不断繁殖的纯杂交瘤细胞。最后将这种纯杂交瘤细胞接种于小鼠腹腔，在腹水中可得到高效价的该药物的单克隆抗体。

2. 抗体质量鉴定

抗体的质量高低与免疫分析方法的质量密切相关。抗体的质量主要体现在抗体与药物结合的特异性、结合容量和亲和性、抗体的活度等方面。一个好的抗体

是指抗体的特异性强，滴度、活度和亲和性能满足测定要求。

（1）抗体特异性　抗体与药物结合的特异性体现了免疫反应的专用性。抗体与药物结合特异性的高低与交叉免疫密切相关，其结果直接影响免疫分析的专属性和准确性。实际上，结构与抗原（药物）相似的其他化合物也可能不同程度地与抗体非特异性结合，干扰药物与抗体结合的特异性。发生这种交叉免疫的程度越大，则免疫分析方法误差也越大，准确性也越差。因此，在评价抗体质量时应对抗体可能发生的交叉免疫程度进行考察，将交叉免疫避免或控制在允许范围内。

抗体与药物的特异性结合决定于抗原决定簇，而非整个药物分子。药物分子上抗原决定簇的多少是决定产生特异性抗体的关键，这就要求药物分子中应有足够多的抗原决定簇，才能在相近结构的化合物中被抗体识别，产生特异性结合，避免结构相近化合物的交叉免疫干扰。然而，绝大多数药物为小分子的半抗原，分子上的抗原决定簇相对较少。另外，一些药物尤其是合成药物具有相同的母核或取代基，而如果母核或取代基成为抗原决定簇时，得到的抗体专一性就比较低。例如，在建立青蒿酯和青蒿素的放射免疫方法时，用青蒿素与牛血清白蛋白制成全抗原，免疫绵羊后得到抗体。绵羊抗青蒿素血清对青蒿素、蒿甲醚、双氢青蒿素和青蒿酯有完全交叉反应，这可能与免疫所用的抗原复合物的连接位置有关。因为这几种化合物母核类似，仅是在 12 位碳上的取代基不同，可能在与牛血清白蛋白连接时，12 位取代基被占据，使其无法发挥决定簇的作用。所以，当药物与载体蛋白相连接时，应使药物与载体蛋白相连接的部位尽量远离药物分子上的抗原决定簇，让抗原决定簇充分暴露而不被掩盖，以提高抗体的专一性，减少交叉免疫的发生。

检查交叉免疫发生的程度可通过作标准曲线的同时再作置换曲线的方法进行考察。置换曲线的做法是：将做标准曲线时加入的药物标准品换为某种可疑的干扰成分，考察它们是否同抗体结合。为了检验交叉免疫反应是否发生，一般免疫分析得到的阳性结果还需用其他一些专属性比较强的分析方法验证其准确性。但免疫分析的阴性结果则可完全判定样品中不存在被测药物。

（2）滴度测定　抗体滴度（或效价）指某一物质与一定量的另一物质产生反应所需要的量，滴度的大小用抗血清的稀释度表示，稀释倍数越大滴度越高。在免疫分析中，滴度对提高分析质量具有重要的意义。滴度的高低是采用标记抗原来测定的，常用的滴度测定方法有免疫扩散法、间接血凝法和酶联免疫吸附测定法（ELISA）等。

（3）亲和力与活度　亲和力是指抗体与特异性抗原的结合能力及结合强度。亲和力的高低取决于分子大小、抗体分子结合位点与抗原决定簇之间的立体构型是否合适。亲和力常用抗体反应结合常数 K（也称为“亲和常数”）来表示，K

值越大抗体亲和力越大。结合常数的计算方法有饱和曲线法和 Scatchard 作图法等。

① 饱和曲线法　取一定稀释度的抗体，逐渐增加抗原浓度，使之与抗体的结合达到饱和，当所加入抗原量的 50%与抗体结合时，反应体系内结合抗原（Ag-Ab）与未结合抗原（Ag）相等，则结合常数 K 为：

$$K=\frac{1}{[\mathrm{Ab}]}$$

即 K 是抗体结合抗原总量的 50%时游离抗体浓度的倒数。

② 免疫分析法　其灵敏度与抗体的活度有关，抗体活度的高低反映了抗体与抗原结合的牢固程度。活度高，表明形成抗原-抗体结合物的速度快、解离度小，测定效果越好。所以，抗体活度的高低与免疫分析的灵敏度有关。此外，免疫分析的灵敏度还与标记药物发出的信号强度以及检测信号强度所使用仪器的灵敏度有关。

由此可见，滴度能反映抗血清中抗体分子的浓度，但不能定量地描述，而结合常数 K 能反映抗血清中抗体结合位点的总浓度，还可以反映抗原抗体的结合率及测定灵敏性。K 值越大表示所建立的免疫分析方法越灵敏，结果的重现性也就越好。

第二节　免疫鉴定的方法

一、放射免疫分析法

放射免疫分析（RIA）是体内药物分析中应用较早、技术比较成熟的免疫分析方法之一，它是在药物上标记放射性同位素，提供的检测信号是放射线。目前，几乎对各类药物都有成功的放射免疫分析方法，它的特点是特异性强、灵敏度高，可用于定性、定量和定位分析。使用此方法，对成分复杂的生物样品无需预处理，具有方便、快速、准确的优点。

抗原和抗体的反应是相当复杂的，为了便于分析，假设抗原和抗体是均一和单价的，用 P 代表抗原，Q 代表抗体，PQ 代表抗原-抗体复合物，k_1 是结合速度常数，k_2 是解离速度常数，则：

$$\mathrm{P}+\mathrm{Q}\rightleftharpoons\mathrm{PQ} \tag{2-1}$$

当反应达到平衡时，设平衡常数为 K，设结合在抗体上的抗原量为 B，游离的抗原量为 F，则有：

$$K=k_1/k_2=[\mathrm{PQ}]/[\mathrm{P}][\mathrm{Q}] \tag{2-2}$$

$$B/F=[\mathrm{PQ}]/[\mathrm{P}] \tag{2-3}$$

由于只有部分 P 和 Q 参与结合，所以

$$[P]=P_0-[PQ]（P_0 \text{ 为抗原的初始浓度}） \tag{2-4}$$

$$[Q]=Q_0-[PQ]（Q_0 \text{ 为抗体的初始浓度}） \tag{2-5}$$

将式(2-4)代入式(2-3)可得：

$$B/F=[PQ]/(P_0-[PQ])\Longrightarrow[PQ]=\frac{BP_0}{F+B} \tag{2-6}$$

再将式（2-4）式（2-5）式（2-6）代入式（2-2）并整理得：

$$(B/F)^2+B/F(1+KP_0-KQ_0)-KQ_0=0 \tag{2-7}$$

式（2-7）为一条二次曲线，所以放射免疫分析的剂量反应为一条弧线。

（一）抗血清的制备

建立放射免疫分析方法的关键之一是要有高亲和力、高滴度和高特异性的抗体。在放射免疫分析方法中，大部分检测对象是小分子半抗原，因此在制备抗体之前先应制备半抗原-蛋白质（人工抗原），使之成为完全抗原。以下就人工抗原制备的相关问题简介如下。

1. 载体的选择

（1）蛋白质类　蛋白质类载体具有很强的免疫原性，又因其表面或一端有自由氨基和自由羧基，容易和半抗原结合。特别是白蛋白，具有溶解度大，免疫活性强，又有标准商品供应，取材容易，是常用的载体之一。此外，也有采用白蓝蛋白、甲状腺球蛋白等分子量更大的载体，以利于每个载体分子上连接更多的半抗原。

（2）非蛋白质类　采用人工合成的多肽聚合物（如多聚赖氨酸）作为载体和半抗原连接，诱发动物产生高亲和力、高滴度的抗体。用这种方法制备的抗血清，排除了抗蛋白质抗体对抗原、抗体反应的干扰。

（3）大分子聚合物和某些粉末类　有些抗原性较弱的肽类激素，如胰高血糖素、促肾上腺皮质激素等，为了提高其抗原性，可以和某些大分子聚合物或某些不溶解的颗粒相结合，注入动物体内，通过保持局部持续性强刺激诱发动物产生优良抗体。常用的物质有聚乙烯、吡咯酮、羟甲基纤维素、炭和乳胶等。

2. 抗体的鉴定

将人工抗原免疫动物后，对获得的抗体必须进行鉴定。通常从抗体的滴度、亲和力和特异性 3 个方面来鉴定抗体。

（二）标记抗原的制备

抗原标记涉及所用放射性同位素的种类、标记方法及标记物的纯化等。在放射免疫分析方法中，常用的核素包括^{3}H、^{125}I 和^{131}I 等。^{3}H 是弱 β 衰变，能量弱，易于防护，由于其衰变周期长，因此，在一次标记后可在较长时间内使用，

但其缺点是标记不能用^3H_2O，而需用$^3H_2$，因此要在真空条件下标记，需要一定的条件和设备。而^{131}I的半衰期较短，因此，在放射免疫分析时，常用^{125}I来标记抗原。以下仅以^{125}I标记抗原进行说明。

放射性碘化标记技术可分为两类：一类是肽、蛋白质和酶类，可以直接进行碘化标记，即直接将^{125}I连接到被标记分子的酪氨酸残基上的羟苯基上；另一类是甾体类化合物、环核苷酸、前列腺素等小分子化合物，因缺乏可供碘标记的部分，多用间接碘化标记法，即把碘标记后的配位体连接到被标记抗原的氨基、羧基和羟苯基上。

下面介绍氯胺T碘化标记法。氯胺T是一种氧化剂，可将带有负电荷的放射性碘离子氧化成放射性碘分子，然后和被测物反应，生成带有放射性的化合物。氯胺T碘化标记法是最常用的直接碘化标记法，具体步骤如下：

抗原(2.5kg)、0.5mol/L 磷酸盐缓冲液(PB)(pH=7.5)(50μL)、$Na^{125}I$[800μCi(1Ci=37GBq)]、氯胺T(30μg)→37℃，作用1min，加偏重亚硫酸钠60μg(终止反应)→纸色谱法测定标记率→Sephadex G_{50}分离纯化→色谱法测纯度→加防腐剂，蛋白质稀释，冷冻干燥→产品

(三) 游离标记物与结合标记物的分离

当抗原和抗体反应达到平衡时，如何将抗原-抗体复合物（B相）和游离抗原（F相）分开是影响放射免疫分析方法精确度和准确度的一个重要环节。近年来，随着放射免疫分析技术的迅速发展，分离方法已有几十种，各有优缺点，具体要根据被测物的物理性质、分子量大小以及缓冲体系来选择。目前较常用的分离方法有以下几种。

1. 活性炭吸附法

许多固体物质颗粒可以吸附反应液中的游离抗原，这种物质被称为吸附剂。活性炭是最常用的吸附剂，它可以无选择地吸附蛋白质、多肽、类固醇和药物等。若将活性炭表面敷上具有一定分子量的葡聚糖，则在其表面可形成具有一定孔径的网眼。该孔径只允许小分子物质进入和吸附。离心沉淀后，就可将B相和F相分开。吸附分离过程如下。

反应液 $\xrightarrow[\text{5min 内加完}]{\text{加 2\%活性炭和 0.02\%右旋糖酐 T-70}}$ 充分振摇，离心 30min(4000r/min)⟶立即去除上清液(F相)，测定沉淀物(B相)

活性炭吸附法操作简单、快速，在使用前过筛，选择一定大小的颗粒，加以活化，即可使用。

2. 沉淀分离法

根据蛋白质的性质，用某些盐类（如硫酸钠或硫酸铵）或有机溶剂［聚乙二醇（PEG）］将蛋白质的电荷和水化层破坏，即可使蛋白质沉淀。根据这一原理，只要选择适量浓度的盐类或有机溶剂，就可以使抗原-抗体复合

物沉淀。

反应液→每管加入30%PEG(相对分子质量6000，用pH=8.6，0.05mol/L巴比妥缓冲液配制)1mL→充分振摇，离心20min(4000r/min)→立即去除上清液(F相)，测定沉淀物(B相)

3. 双抗体法

抗原和抗体反应所生成的复合物是可溶性的。如将某种激素注射给家兔，结果所产生的抗体，仅和某种激素具有特异性结合，这种抗体称为第一抗体。如果将兔的γ-球蛋白给羊注射，则羊产生的抗兔γ-球蛋白称为第二抗体。当某种激素和标记激素与抗体混合温育后，再加第二抗体，于是第二抗体和B相结合为更大的复合物，经离心沉淀而分离。

抗原抗体反应达平衡后→每管加第二抗体(如羊抗兔血清)0.1mL，2%正常兔血清0.3mL $\xrightarrow{37℃水浴1\sim2h}$ 见絮状沉淀后，离心15min(3000r/min)→立即去除上清液(F相)，测定沉淀物(B相)

4. 固相分离法

固相系指预先将抗体与固体颗粒或固体表面结合，形成不溶解但仍保持抗体的特异性结合能力。当被测物、标记物的溶剂加至固相抗体中，经反应后，液相中的标记物被结合到固相支持物上，洗去未结合的标记物，即可将B相和F相分离。固相法简便、快速，从而已经发展成为了一种固相放射免疫分析方法。

反应液→每管加入羊抗兔IgG羧化聚苯乙烯乳胶结合的免疫微球1mL(加前振摇)→37℃水浴15min，离心20min(4000r/min)→立即去除上清液(F相)，测定沉淀物(B相)

5. 微孔薄膜分离法

微孔薄膜是一种具有一定孔径的特殊过滤膜，直径0.25mm，微孔直径≤0.45μm，一般多采用孔径为0.25μm的。将反应后的溶液放入装有微孔薄膜的滤器上，经抽滤后，标记物如系小分子化合物，则被滤出，而大分子的复合物被吸附在微孔薄膜的表面。从而将F相和B相分离。

(四) 标准曲线

标准曲线又称剂量反应曲线，即用标准物浓度对结合率作图。在RIA中，被测物质的浓度（量）是从标准曲线上查得，同时标准曲线又是验证方法的灵敏度、检验抗血清的质量、鉴定标准品纯度的主要依据，因此，标准曲线的设计和制作是非常重要的工作。随着计算机的普及与应用，可以通过计算机放射免疫处理程序来绘制标准曲线。

1. RIA反应体系

建立标准曲线的条件要与被测物质的相一致，并在每次检测时同时要做标准曲线，这样可消除测定时理化因素的影响，提高校测的正确性（表2-1）。

表 2-1　RIA 反应系统

项目	空白对照管 (NSB)/μL	"0"标准管 (B_0)/μL	标准品管 ($B_{1\sim6}$)/μL	样品管 (S)/μL	总计数管(T)/μL
抗血清	—	100	100	100	
标准品	—	—	50	—	
标记抗原	50	50	50	50	50
样品	—	—	—	100	
缓冲液	450	350	300	250	

注：4℃条件下反应 48h，分离 F，测定 B 的放射性（cpm）。

2. 标准曲线的制作

标准曲线的绘制方法有几种，各种方法的区别在于纵坐标的表现形式不同，通常用 cpm，B/T，B/B_0 和 logit 等表示，例如：

$B/B_0=[(B\text{cpm}-NSB\text{cpm})/(B_0\text{cpm}-NSB\text{cpm})]\times 100\%$

3. 标准曲线的直线化

通常用普通对数法 lg-lg 和自然对数法 logit-lg 将标准曲线直线化，方法是将 X 轴的抗原剂量取对数，Y 轴反应参数用 $\lg\dfrac{B}{B_0-\text{B}}$或 $\ln\dfrac{B}{B_0-\text{B}}$表示，得到标准直线。

二、荧光免疫分析法

荧光免疫分析（FIA）法是一种以荧光物作为标记物的免疫分析技术，荧光物质的分子在特定条件下吸收激发光的能量后，呈激发态而极不稳定，因此，处于激发态分子将迅速回到稳定的基态，并以电磁辐射形式释放出所有的光能，发射出波长较照射光长的荧光。荧光免疫分析法可分为荧光免疫组织化学法和荧光免疫测定法两大类。荧光抗体技术属于前者，它是利用某些荧光素通过化学方法与特异性抗体结合制成荧光抗体，使其仍保持原抗体的免疫活性，然后使荧光抗体与被检抗原发生特异性结合，形成的免疫复合物在一定波长光的激发下可产生荧光，因此借助荧光显微镜检测或定位被检抗原。根据所用的方法可分为直接荧光抗体法、间接荧光抗体法和补体荧光抗体法。

（一）荧光抗体的制备

荧光素是指可产生明亮荧光的染色物质。目前常用的荧光素有异硫氰酸荧光素（FITC）、四乙基罗丹明（RB200）、四甲基异硫氰罗丹明（TRITC）3 种，其中最常用的是异硫氰酸荧光素。

异硫氰酸荧光素（FITC）易溶于水和乙醇。最大吸收光谱为 490～495nm，最大发射光谱为 520～530nm，呈黄绿色荧光，相对分子质量为 389.4。在碱性条件下，FITC 的异硫氰酸基在水溶液中与免疫球蛋白的自由氨基经碳酰氨化而

形成硫碳氨基键，成为标记荧光免疫球蛋白，即荧光抗体。

（二）荧光抗体染色法

1. 直接法

用特异荧光抗体滴于待测抗原样品上，标记抗体与抗原发生特异性结合，呈现荧光的分布和形态，以此来确定抗原的存在与否及其抗原性的部位。操作如下。

（1）染色　切片经固定后，滴加经稀释至染色效价为1∶8或1∶16的荧光抗体，37℃湿盒内温育30min。

（2）洗片　弃存留的荧光抗体，将切片侵入pH 7.4或7.2的磷酸盐缓冲液（PBS）中洗2次，每次15min，再用蒸馏水洗1min。

（3）封固　用50％的甘油（0.5mol/L pH 9.5碳酸缓冲液稀释）封固，镜检。

（4）对照染色　设置阴性和阳性对照。

2. 间接法

该法是用未标记的特异性抗原加在切片上先与标本中的相应抗体（第一抗体）结合，再用针对第一抗体的抗抗体（第二抗体、荧光抗体）重叠结合，从而间接地显示出组织或细胞中抗体的存在。操作如下。

① 切片固定后，置于染色湿盒内。

② 滴加未标记的特异性抗原于切片，37℃作用30min。

③ 0.01mol/L pH 7.2PBS洗2次，每次5min，吹干。

④ 滴加特异性荧光抗体于切片，37℃作用30min。

⑤ 同③水洗。

⑥ 缓冲甘油封固，镜检。

⑦ 对照染色，设阴性对照和阳性对照。

3. 补体法

在抗原和抗体反应时加入补体（多用豚鼠补体），再用荧光标记的抗补体抗体进行示踪。操作如下：

① 涂片或切片固定。

② 取适当稀释的免疫血清及补体等量混合，将混合液滴于切片上，37℃湿盒内温育30min。

③ 0.01mol/L pH 7.2PBS洗2次，搅拌，每次5min，吸干标本周围水液。

④ 滴加适当稀释的抗补体荧光抗体，37℃放置30min。

⑤ 同步骤③。

⑥ 蒸馏水洗1min，缓冲甘油封固，镜检。

⑦ 设抗原、抗血清及灭活补体对照（均为阴性）。

（二）荧光偏振免疫分析（FPIA）

1. 原理

该法是一种利用物质分子在溶液中旋转速度与分子大小呈反比的特点对荧光标记抗体进行检测的技术。在免疫系统中，Ag 旋转比 Ag-Ab 快；以荧光物质标记的抗原（Ag^F）与标本中的抗原（Ag）竞争结合特异性抗体（Ab），形成（Ag^F）-Ab，而 Ag^F-Ab 旋转比 Ag^F 慢。当反应接受一个偏振光面的投入时，如果 Ag^F 分子的长轴与投入的偏振光面平行，荧光物吸收的偏振光最多，分子呈激发态，当分子回到基态时就会发射一个偏振荧光。如果反应液中的分子发生旋转，发射的偏振光就会减弱，减弱的程度与分子旋转的速度成正比，与分子大小成反比。

标本溶液通常受垂直偏振光激发后，在与激发光呈适当角度处用第 2 个偏振器测量发射荧光强度，其偏振面既可垂直定位也可水平定位（图 2-1）。在标本测定时，标本中 Ag 浓度愈低，产生的 Ag^F-Ab 愈多，游离的 Ag^F 愈少，反之亦然。Ag^F-Ab 愈多，偏振光就愈强，根据荧光偏振的改变测定标本中 Ag 的浓度，偏振光强度与标本中 Ag 浓度成反比。用已知浓度的分析物制备标准曲线，未知浓度的样品可通过与标准曲线比较得出结果。

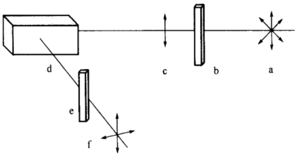


图 2-1　荧光偏振测定原理

a—激发光源发出的非偏振光；b—激发光偏振器；c—垂直偏振光；d—样品杯；
e—发射光偏振器；f—通过发射光偏振器测量发射荧光的垂直和水平组分

FPIA 的结果取决于荧光标记的好坏、激发态的平均寿命、抗原的相对分子质量和复合物的特性等因素，常用的荧光素为 PITC。与其他免疫学分析方法相比，该法具有下述优点：①简便的均相测定方案，易于快速、自动化进行；②如果设计和储存得当，荧光标记试剂使用寿命很长，并使测定的标准化结果可靠；③用空白校正或其他方法去除干扰，可获得准确结果。FPIA 通常不适合大分子物质的测定，与非均相荧光免疫分析方法相比，灵敏度稍低。

2. 环孢霉素 FPIA 测定实例

（1）仪器与试剂

① 仪器　荧光偏振免疫检测仪、专用离心机、样品混合器。

② 试剂　环孢霉素标准品（0.8ng/mL、50ng/mL、100ng/mL、200ng/mL、500ng/mL、1000ng/mL）；质控品（低 75ng/mL、中 250ng/mL、高 700ng/mL）；稀释缓冲液；除蛋白剂荧光标记环孢霉素；单克隆抗体。

（2）方法

①预置仪器。②环孢霉素标准品（2 份）、质控品和样品分别加入到离心管中，每管加入 150μL 除蛋白剂，振荡 10s 后，离心 3min（9500r/min）以上，取上清液。③将上述两份标准品、一份质控品和样品的上清液各取 150μL 加入样品盘上，在试剂架上放置好后，指示机器工作。④输出结果。

（四）时间分辨荧光免疫分析（TR-FIA）

1. 原理

该法是一种以稀土金属螯合物标记抗体，利用荧光发射体荧光寿命差别而将波长相同的荧光分开的近代荧光光谱技术。来自组织或血清中各种蛋白荧光和其他化合物的非特异性荧光的寿命一般在 1～10ns，最长不超过 20ns。如血清白蛋白为 4.1ns，球蛋白为 3.0ns，FITC 的荧光寿命为 4.5ns，而稀土金属螯合物具有相当长的荧光寿命（10μs～1ms），比背景荧光长 3～4 个数量级，荧光消失的速度远较背景非特异性荧光慢得多。因此，若延缓测量时间，待短寿命的非特异性荧光完全衰退后，所测得信号则完全为长寿命的稀土金属螯合物的荧光，这就有效地消除非特异性本底荧光的干扰（图 2-2）。

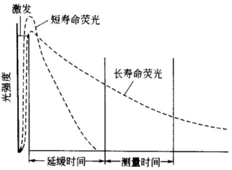


图 2-2　TR-FIA 原理示意图

本法的操作过程与一般标记免疫测定基本相仿，标准品或标本加于包被抗体的孔中，温育后洗涤，加入 Eu^{3+} 标记的抗体，温育洗涤后，加增强液，于时间分辨免疫荧光计上测量荧光强度。

增强液的作用是使荧光信号增强，因为免疫反应完成后生成的抗原抗体标记复合物在弱碱性溶液中，经激发后产生的荧光信号很弱。在增强液中，pH 降至 2～3，Eu^{3+} 很容易解离出来，并与增强液中 β-二酮体结合成有强烈荧光的新的螯合物，极大地有利于荧光测量。

2. 方法　血清总甲状腺素（T_4）及三碘甲状腺原氨酸（T_3）TR-FIA 测定实例。

（1）仪器与试剂

① 仪器　时间分辨荧光仪。

② 试剂　分析缓冲液：0.1mol/L pH7.5 Tris-HCl 缓冲液，其中含 0.3mL/L

三氯醋酸钠，0.1%牛血清白蛋白（BSA），0.02% NaN_3。洗涤液：含 9g/L NaCl，1mL/L 吐温-20 的去离子水。荧光增强液：β-萘酰三氟丙酮 6mg，三辛基磷化氢的氧化物 19.33g，邻苯二甲酸氢钾 1.38g，冰醋酸 6mL，吐温-20 0.2mL，加三蒸水至 500mL，加 Triton X-100 1mL，置于 37℃水浴至溶解后补加三蒸水至 1000mL，于塑料瓶内保存备用。标准物：T_4 标准物为 2μg/L、4μg/L、8μg/L、16μg/L、32μg/L 5 个浓度点；T_3 标准物为 50ng/L、100ng/L、200ng/L、400ng/L、800ng/L 5 个浓度点。

（2）操作方法

① Eu^{3+} 标记 Tg　1mg 甲状腺球蛋白（Tg）和 1mg CDTPA 溶于 0.5mL 碳酸盐缓冲液（0.1mL/L，pH8.2）中，室温反应 10min，用 1mL/L $NaHCO_3$ 调 pH 至 9.0，用饱和硫酸铵沉淀。沉淀溶于 0.5mL 1200μL/L $EuCl_3$ 溶液（0.1mL/L pH6.0 柠檬酸缓冲液配制），反应 40min，Sephadex G-50 柱色谱分离，得 Eu·CDTPA·Tg。

② $T_4(T_3)$ 抗体固相包被 12 孔聚苯乙烯滴定条件　用 0.1mL/L pH9.0 碳酸盐缓冲液将 $T_4(T_3)$ 抗体稀释到 10μg/mL，取 100μL 加入滴定条孔中，室温放置 20h。

③ 洗涤　洗涤液洗 1 次，4℃湿润密封存放。

④ TR-FIA 测定 $T_4(T_3)$　a. 将 T_4-Ab(T_3-Ab) 包被的杯条用洗涤液洗 3 次。b. 分别加入 $T_4(T_3)$ 标准物及待检血清，每孔 20μL。c. 每孔加入 100μL 分析液稀释的 Eu·Tg，室温反应 2h。d. 洗涤液洗 10 次。e. 每孔加入 200μL 荧光增强液，慢慢振动 5min 后，静置 30min。f. 运用时间分辨荧光仪（ARCUS-1230）测定荧光强度（CPS）。

⑤ 结果分析　以 $T_4(T_3)$ 标准物的不同稀释度为横坐标，其相应的荧光强度为纵坐标绘制标准曲线，并计算待测血清中的 $T_4(T_3)$ 浓度。

（五）猝灭荧光免疫分析（QFIA）

1. 原理

当用荧光物质标记药物后，标记药物与抗体结合，荧光强度减弱。在样本测定时，被测药物（未标记抗原）与标记药物（标记抗原）竞争性地与抗体结合，被测药物多，标记药物就结合得少，即未结合的标记药物剩余的多。因此，荧光被猝灭的少，即荧光强度高。所以被测药物的浓度与荧光强度成正比，与荧光猝灭的程度成反比。

虽然由发光原理可知，荧光猝灭过程必定发生能量转移。研究发现，不同种动物产生的抗体对荧光的猝灭有差异；亦有报道在测定体液中吗啡浓度时，用荧光素标记药物，还需用罗丹明 B 预先连接在抗体上作为荧光猝灭剂。因此，关于标记药物与抗体之间能量发生转移时的规律有待研究。

QFIA 法的方便之处在于测定时无需分离，直接在荧光分光光度计上就可以读出荧光强度值 F。但由于自然界干扰荧光的物质较多，这些物质的干扰可以造成测定结果的偏差，因此，QFIA 测定时受到的外界干扰可能多于 FPIA 法。为了减小测定误差，测定时应严格控制反应条件，所用的各种玻璃仪器要洗干净。

2. 方法——以猝灭荧光免疫法测定微量血清中庆大霉素浓度为例

（1）仪器与条件　荧光分光光度计，激发波长 495nm，发射波长 540nm，荧光素标记的庆大霉素（FTC-GTM）和抗庆大霉素兔血清。

（2）实验步骤及标准曲线　取 22μL 含庆大霉素的血清于试管中，加 0.8mL 荧光素标记的庆大霉素储备液（10.072ng/mL）和 0.2mL 抗血清（1∶625），用磷酸缓冲液（0.1mol/LpH4.8）加至总体积 5mL，混合均匀，室温反应 30min，直接在荧光分光光度计上读出荧光强度值（F）。用标准药物血清的浓度与 F 值的双对数做标准曲线。

回收率及精密度：取庆大霉素浓度为 1.0μg/mL、4.0μg/mL、8.0μg/mL 的血清进行测定，回收率分别为 104.2%、94.2%、99.6%。取庆大霉素浓度为 0μg/mL、3.0μg/mL、6.0μg/mL、10.0μg/mL 的血清样品重复测定，日内相对标准偏差（*RSD*）分别为 10.66%、7.11%、6.95%、5.35%，日间 *RSD* 分别为 13.20%、9.0%、9.54%、8.99%。

三、酶免疫分析法

（一）酶放大免疫分析（EMIT）

1. 测定原理

抗原用酶标记后，酶的活性发生两种可能的变化：第一种可能是受到抑制；第二种可能是保持不变。在第一种情况下，酶标记的抗原与抗体结合后，使原来受到抑制的酶活性得到恢复，而第二种情况却使原来保持不变的酶活性被抑制。在具体测定中，加入的未标记抗原（待测药物或对照品）与酶标记的抗原竞争抗体，使酶标记抗原与抗体的结合减少，导致酶活性改变的程度发生变化，据此可以通过酶与底物作用后生成的有色反应产物表现出来。由于有色反应产物的生成与被测药物的量密切相关，因此可用紫外-可见分光光度法定量。

2. 测定方法

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶（G-6-PDH）标记的 EMIT 法是目前用于血药浓度监测最常用的方法之一，以 G-6-PDH 标记的 EMIT 法测定苯妥英为例。

试剂盒中有两种试剂：试剂 1 含有抗体、葡萄糖-6-磷酸盐（酶作用的底物）、辅酶Ⅰ(NAD) 和缓冲溶液；试剂 2 含有 6-磷酸葡萄糖脱氢酶标记的苯妥英和缓冲液。

测定时先让待测样品与试剂 1 充分混合，生成抗原-抗体复合物；然后加入

试剂 2，样品中的苯妥英与试剂 2 中的酶标记苯妥英竞争抗体。

酶标记苯妥英与抗体结合后，酶失活，无法与底物作用，只有未结合的酶标记苯妥英与底物作用，使其生成 6-磷酸葡萄糖内酯，同时将辅酶Ⅰ（NAD）还原生成还原辅配酶（NADH），由于 NADH 在 340nm 处有吸收，NAD 在此波长处无吸收，因此，样品中苯妥英量越大，340nm 处吸光度越高。

用不同浓度的药物对照品代替样品同法操作，即可建立浓度-吸光度标准曲线，供样品测定用。

3. 应用实例

（1）试剂盒

试剂 1：抗体、底物、辅酶Ⅰ（NAD）、保存剂［0.05mol/L Tris-HCl 缓冲液（pH5.0）］及代谢物（MEGX）标准品。

试剂 2：酶标记的利多卡因以及保存剂［0.055mL/L Tris-HCl 缓冲液（pH7.9）］，标记酶是 6-磷酸葡萄糖脱氢酶。

其他试剂：①0.055mL/L Tris-HCl 缓冲液（pH7.9）10mL，加水稀释至 150mL（以下简称 TB 缓冲液）；②标准品和质控对照品，试剂盒内有 6 个不同量的利多卡因标准品的小瓶及 1 瓶利多卡因质控对照品，标准品瓶中加入 1mL 蒸馏水，配置利多卡因标准溶液，浓度（mg/L）分别为 0.0、1.0、2.0、3.0、5.0、12.0，质控对照品瓶中加入 3.0mL 蒸馏水，浓度为 4.0mg/L。

（2）标准曲线制备及样品测定

① 标准曲线制备　精密量取各标准品溶液 50μL 置于 2mL 烧杯中，加 250μL TB 缓冲液，混匀后吸取 50μL 移入另一 2mL 烧杯中，再加入 250μL TB 缓冲液充分混匀，加 50μL 试剂 1 及 250μL TB 缓冲液后，再加入试剂 2 和 250μL TB 缓冲液，立即将反应液置比色皿中，在 340nm 处测定光吸光度。用标准品溶液的光吸收度的变化率 ΔA 减去空白溶液的变化率 ΔA_0，得到标准液各浓度对应的（$\Delta A-\Delta A_0$）值，以此值为纵坐标，标准液浓度为横坐标，在半对数坐标纸上作图即得标准曲线。

② 样品测定　精密吸取血清或血浆样品 50μL，测定吸光度。

（二）酶联免疫吸附测定法（ELISA）

1. 基本原理

酶联免疫吸附测定法按其反应机理概括为以下两种类型。

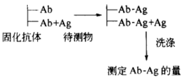


图 2-3　直接测定法原理

（1）直接测定　该法是直接测定与固化抗原（或固化抗体）结合的抗体（或抗原）的量（图 2-3）。

（2）间接测定　该法是利用竞争性原理，根据固化抗原或抗体与已知竞争物相互作用来

测定未知抗体或抗原的量（图 2-4）。

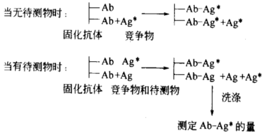


图 2-4 间接测定法原理

2. 测定方法

（1）直接法 以检测抗原为例，按照下列程序进行：①对待测抗原适当稀释，用不同稀释度的待测样品包被酶标反应板，孵育后洗涤。②封闭酶标反应板，孵育后洗涤。③加入酶标抗体，孵育后洗涤。④加入酶底物溶液，测定酶促反应强度。

（2）间接法 测定抗特定抗原成分的特异性抗体，按照下列程序进行：①用有关抗原包被酶标反应板，孵育后洗涤。②用封闭液封闭酶标反应板，孵育后洗涤。③加入待测样品，孵育后洗涤。④加入酶标记的第二抗体（或第二抗体替代物，如酶标 SPA 等），孵育后洗涤。⑤加入酶底物溶液，测定酶催化活性。

（3）双夹心法 按照下列程序进行：①用纯化的某种动物特异性抗体或含有特异性抗体的抗血清包被酶标反应板，孵育后洗涤。②用封闭液封闭酶标反应板，孵育后洗涤。③加入待测样品，孵育后洗涤。④加入与包被酶标板不同种动物的特异性抗体，孵育后洗涤。⑤加入抗第二种动物特异性抗体的酶标抗体，孵育后洗涤。⑥加入酶底物，测定酶促反应强度。

（4）竞争法 又称竞争性抑制法，是根据标记抗原与同种未标记待测抗原与抗体间可发生竞争性结合的原理，主要用于测定小分子抗原。按照下列程序进行：①用纯化的特异性抗体或含有特异性抗体的抗血清包被酶标反应板，孵育后洗涤。②用封闭液封闭酶标反应板，孵育后洗涤。③加入待测样品，再加入一定量的酶标记抗原（对照孔仅加入酶标记抗原），孵育后洗涤。④加入酶底物，测定酶促反应强度。对照孔出现明显颜色反应，测定孔内颜色的深度与待测液中抗原的含量成反比。

（5）桥联法 又称抗酶抗体法或不标记抗体酶法。其基本原理是利用抗同种动物免疫球蛋白的抗血清，将直接或间接结合在抗原上的抗体和抗酶抗体连接在一起，使酶间接地连接到待测抗原上（又称“搭桥”），然后通过底物显色进行检测。该法可用于检测抗原或相应抗体，其特点是不需要纯化抗血清，操作简便、

特异、敏感和重复性好。按照下列程序进行：①如用于检测抗原，将待测样品包被到空白酶标反应板上，孵育后洗涤，再用封闭液对反应板进行封闭，加入相应第一抗体，孵育后洗涤；如用于检测相应抗体，则用抗原包被酶标板并进行封闭后，加入待测抗体，孵育后洗涤。②加入第二抗体（抗同种动物免疫球蛋白抗血清），孵育后洗涤。③加入与待测抗体同种属的抗酶抗体，孵育后洗涤。④加入抗酶抗体所对应的酶类，孵育后洗涤。⑤加入酶底物，并对其催化活性进行检测。

3. ELISA 应用实例　基因工程药品中微量致敏性杂质青霉素噻唑蛋白的测定

基因工程药品的细胞培养或发酵过程中常需加入一定量的青霉素。为确保基因工程药品的产品质量，可用酶联免疫吸附测定法检测是否残存有过敏性杂质——青霉素噻唑蛋白。

① 包被，用碳酸缓冲液（0.1mL/L，pH7.6）直接包被待测抗原，200μL/孔；包被 BPO_4-CY 作为阳性对照，包被抗原不加抗 BPO 血清和不包被抗原加 BPO 血清两组阴性对照；另设待测抗原-BSA 抗血清相互作用组作为阴性血清对照；4℃冰箱过夜。

② 用洗涤液（BPS 0.01mol/L，pH7.2）洗涤 3 次，每次 3min。

③ 与特异性抗体反应：在经洗涤好的酶标板中加入稀释至一定滴度的抗 BPO 血清或抗 BPO 单克隆抗体，200μL/孔，37℃保温 2h。

④ 洗涤 3 次。

⑤ 与酶联抗抗体反应，再加入 1∶50 稀释的 GAR-IgG-HRP200μL/孔，37℃保温 1h。

⑥ 洗涤 3 次。

⑦ 加入 OPD 底物液，200μL/孔，37℃显色。

⑧ 用 1mL/L 的硫酸终止反应，50μL/孔，用酶标仪测定其在 492nm 波长处的光吸收值。

⑨ 结果判断：当阳性孔呈阳性，阴性血清呈阴性时实验成立。此时当待测抗原的测定结果大于阴性对照均值（$\bar{x}$）与其 2 倍标准差（SD）之和（$\bar{x}+2SD$）时，被判为阳性；小于（$\bar{x}+SD$）时，被判为阴性；在（$\bar{x}+2SD$）与（$\bar{x}+SD$）之间，需要调整实验条件重新测试。该实验对结合青霉素的绝对检出量小于0.3×10^{-6}。

四、免疫扩散法

免疫扩散是根据抗原和抗体在琼脂介质中扩散的结果，对其性质进行分析的一种方法。这里的琼脂介质是指琼脂凝胶，是一种半固体的多孔网状物质。绝大多数

抗原和抗体的相对分子质量都在 20 万以下，能够在琼脂凝胶中自由扩散，并在凝胶中形成扩散物的浓度梯度，在抗原与抗体最适比例处，形成肉眼可见的免疫沉淀。由于不同抗原物质的扩散系数不同，扩散速度就不同，这样就可达到分离鉴定的目的。

（一）单向免疫扩散

1. 原理

单向免疫扩散是指抗原或抗体之一成分扩散的方法，根据形式可分为试管法和平板法两种。平板法由 Mancini 于 1965 年提出，是目前最常用的抗原定量技术。如将抗体与琼脂混合，置抗原于凝胶孔中，抗原则呈辐射状扩散，并在孔的周围与抗体形成可溶性的免疫复合物。继续向外扩散，与更多的抗体结合，直到抗原与抗体的等当点时，即形成一个沉淀环。由于试验过程中抗原向四周扩散，故称为单向辐射状免疫扩散（SRID）。沉淀环的直径与孔中抗原的量以及抗体在凝胶中的浓度有关。当用已知量的参考品作标准曲线时，根据标准曲线和样品孔沉淀环的直径，就可测得样品中相同抗原的量。相反，若将抗原加入凝胶而将抗体加入凝胶孔中，则可测定抗体的浓度。

2. 方法

① 取一块玻璃板，用水冲洗干净后，再用少量 75%乙醇冲洗，晾干后置于水平台备用。

② 制备 1%琼脂糖（agarose）（用 pH8.6，0.1mol/L 巴比妥-巴比妥钠缓冲液配制），56℃水浴中保温。

③ 取 15mL 琼脂糖（agarose）于 56℃预热玻璃管中，加入适量抗血清（约 200μL），充分混匀后铺于玻璃板上。

④ 待凝胶凝固后打孔（直径 3mm）（图 2-5）。

⑤ 将系列稀释的标准抗原和待检抗原分别加到凝胶孔中，每孔 5μL。

⑥ 将凝胶板置于湿盒内，室温过夜（24h 以上）后观察结果，拍照。

⑦ 绘制标准曲线（图 2-6），测出样品中相应抗原含量，如需要，凝胶板可压片、干燥和染色后保存。

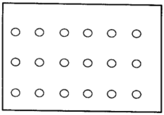


图 2-5　打孔模板

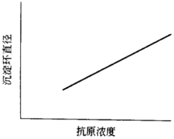


图 2-6　标准曲线

由于沉淀环直径的大小与抗原或抗体浓度相关，因此检测时应先调整抗体和抗原各自的最适浓度，抗体最适浓度应使免疫扩散后的沉淀环边缘清晰，且能测出血清中免疫球蛋白的正常值和最大限度的异常值。若抗体浓度过高，形成的沉淀环直径小；浓度过低，不易检测抗原的最高限浓度。沉淀环的大小与所检测的抗原浓度成正比，抗原浓度过低时，沉淀环太小，不易测定；过高时，沉淀环太大，浪费抗血清。

(二) 双向免疫扩散

1. 原理

双向免疫扩散是指抗原和抗体在同一凝胶内都扩散，彼此相遇后形成特异性的沉淀线。该法是将抗原与抗体在同一凝胶板中、两个相隔一定间距的小孔内进行相互扩散，当抗原与抗体浓度之比相适宜时，彼此相遇后形成一白色弧状沉淀线。

该法最早由 Ouchterlony 创立，故又称 Ouchterlony 法。它与单向免疫扩散类似，双向免疫扩散也常用平板法。在同一凝胶中，当两个抗原的决定簇相同时，则两抗原与抗体形成的沉淀线相吻合［图 2-7(a)］；若两抗原的决定簇完全不同时，则与抗体所形成的沉淀线呈不相关的交叉线［图 2-7(b)］；若两种抗原有部分决定簇相同时，则与抗体形成部分吻合或部分交叉的沉淀线［图 2-7(c)］。沉淀线的形态、清晰度及位置等还反映了抗原或抗体的各种性质。若沉淀线正处于两个样品孔之间，说明抗体抗原浓度适宜，扩散速率相似；反之，若抗原抗体浓度相似但扩散速率不同，或它们的浓度不同而扩散速率相似，则形成的沉淀线往往偏于扩散速率慢的或浓度低的孔。若抗原（或抗体）的浓度大大超过抗体（或抗原）时，则沉淀线模糊，这是由于沉淀线向浓度低的一方扩散的缘故。

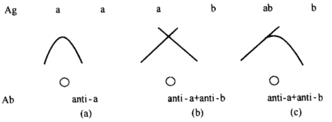


图 2-7　双向扩散基本图形

2. 方法

① 将两块玻璃板用水洗净，再用 75％乙醇冲洗，晾干后放在水平台上备用。

② 将 1％琼脂糖（agarose）熔化后，置 56℃水浴。

③ 在每块玻璃板上铺 15mL 琼脂糖（约 1.5mm 厚），凝固后打孔（直径 3mm），孔间距 10mm。

④ 中心孔加 5μL 抗血清，周围孔每孔加 5μL 抗原样品。

⑤ 将凝胶板置于湿盒内，室温扩散 24h。

⑥ 观察实验结果，拍照。如需要，凝胶板可压片、干燥和染色后保存。

3. 应用实例

虎骨、豹骨的骨质中存在着虎或豹的特异性蛋白质，具有免疫特异性，将其免疫实验动物，可分别制取与相对应的抗原间具有相对应的极性基的特异性抗体（称鉴定试剂）。

当鉴定试剂与检品中相对应的特异性抗原进行特异结合后，出现沉淀反应，用以鉴定虎骨、豹骨等。实验方法如下。

（1）标准抗原的制备（骨抗原的制备） 将虎、豹、猫、牛、猪的骨骼清除残肉及肌腱，脱脂、粉碎后过 80 目筛，用无热原蒸馏水于 4℃ 冰箱中反复提取后，浓缩、冻干、冷藏保存备用。

（2）抗体的制备（鉴定试剂的制备） 将各骨骼抗原提取液，分别免疫家兔。抗原免疫总量为 184mg，免疫程序完成后，用环状试验测定抗体效价，待抗体效价达 1∶500 以上即可大量采血。抗血清经处理、提纯后，便可制备免疫鉴定用的鉴定试剂。试剂分为虎组骨鉴定试剂（组试剂）和单价骨鉴定试剂（单价试剂）。组试剂可将检品鉴定到是否在猫科（包括东北虎、雪豹、云豹、金钱豹、猞猁）的范围内。单价试剂可将检品鉴定到具体物种。单价试剂分为东北虎、雪豹、云豹、金钱豹、猞猁、黄牛、猪、原猫等骨鉴定试剂。

（3）虎骨、豹骨免疫鉴定操作方法

① 检品（待测抗原）的制备 取不带肌肉的净骨骼细粉（80 目）1g，加新鲜蒸馏水 4～5mL，按骨抗原的制备法进行制备，不需浓缩，置 4℃ 冰箱内备用。

② 骨鉴定试剂的配制 将冻干品组试剂加入 1mL 新鲜的 0.1%$NaNO_3$ 溶液、冻干品单价试剂加入 0.5mL 新鲜的 0.1%$NaNO_3$ 溶液，待完全溶解后移至 2mL 加盖小瓶中，置 4℃ 冰箱内备用。

③ 鉴定操作 用组试剂进行鉴定时，多用对流免疫电泳法，亦可用双向扩散法。用单价试剂进行鉴定时，多用双向扩散法，亦可用单双向扩散法。

④ 实验结果 猫科动物骨抗血清与猪骨、牛骨抗原以及猪骨、牛骨抗血清与猫科动物骨抗原间均不发生交叉反应；猫科动物中的原猫骨与虎骨、豹骨、猞猁骨之间均不出现交叉反应，所以可以用于品种鉴定。

五、免疫电泳法

免疫电泳法是利用电场作用下，带电蛋白质在琼脂凝胶中具有不同的迁移率，以及相同的蛋白质具有完整的抗原性的特点，用于分析抗原或抗体性质的一种方法。

该法可用于检查蛋白质制剂的纯度，分析蛋白质混合物的组分，研究抗血清

制剂中是否具有抗某种已知抗原的抗体，检验两种抗原是否相同。

免疫电泳主要包括简易免疫电泳、对流免疫电泳、“火箭”免疫电泳、双向免疫电泳，现将其方法介绍如下。

（一）简易免疫电泳

1. 原理

简易免疫电泳是蛋白质（或蛋白质混合物）在琼脂凝胶中电泳，然后与加入的抗体进行免疫双向扩散，形成沉淀弧，据此进行免疫鉴定。第一步是将蛋白质的不同组分依据其性质差异进行分离，第二步是双向免疫扩散过程（图 2-8）。



图 2-8　双向免疫电泳扩散过程

简易免疫电泳是把抗原置于用缓冲液配制的琼脂板预先打好的孔穴内，进行电泳。同时凝胶中已刻一槽，其方向与电场相平行，同时与蛋白质泳动的路线相距几毫米，电泳后，抗原所含组分按各自的理化性质分成不同的区带。此时，将待测蛋白质的抗体加入槽内，抗原与抗体进行双向扩散。当抗原与相应的抗体相遇并达到等量时，则形成沉淀弧。每种抗原组分可形成一个沉淀弧，借助沉淀弧线来观察这类复合物。

2. 操作方法

① 取 2g 左右琼脂凝胶与 98mL 巴比妥缓冲液在沸水浴中加热备用。

② 用乙醇将载玻片洗净并用玻璃刀标出阴极、阳极。将载玻片置于水平台上，用熔化的琼脂凝胶在其表面涂一层膜，待琼脂凝固并干燥后，将 3.5mL 熔化的琼脂轻轻吸到已涂布琼脂的载玻片上，静置，直至琼脂冷却凝固。

③ 用吸管的尖端在琼脂上打孔，将孔内的琼脂吸出。用解剖刀刻一槽（不去除凝胶条，待电泳完成后才将槽中琼脂条除去）。

④ 精确取 2μL 蛋白质-巴比妥缓冲液（浓度为 1mg/mL）加入小孔中。将载玻片横放在电泳槽的桥上，用巴比妥缓冲液将装有电极的储液槽注满，凝胶末端用湿润的滤纸接入储液槽中。

⑤ 盖住电泳槽，接通稳压电源，每块载玻片供 10mA 左右电流，电场强度约 6V/cm，电泳时间为 20～30min。

⑥ 电泳结束后，取出载玻片，挖出槽中的琼脂，将约 0.1mL 的抗血清（或含 IgG 的抗体制剂）注入槽中，然后在湿润的环境中室温下放置 48h“展谱”，随后观察沉淀弧线，或制成永久性免疫电泳板。

3. 影响免疫电泳沉淀弧形状的因素

免疫电泳后产生的沉淀弧形状受电泳迁移率和双扩散等因素的影响，主要有下面几种情况。

（1）交叉弧　由两个泳动率和抗原性不同，但结构略有差异的组分形成的。

（2）平行弧　由两个泳动率相同，但抗原性与扩散率不同的组分形成的。

（3）中空弧　沉淀弧中间分裂成双线，而两端仍相连，它是由于抗原过量形成的。

（4）二端分支弧　是由于抗体过量形成的。

（5）菜盘形弧　沉淀弧逐渐加宽弥散接近抗体槽，使其呈菜盘纵切面形态。一般也是由于抗原过量形成的。

（6）扭曲不正弧　可能有以下 6 种原因所形成：①抗原蛋白质的浓度过高，或含有不溶性颗粒；②琼脂浓度过高；③抗原渗透压过高；④抗原离子强度过高；⑤抗原或抗体槽破裂，或玻璃板的琼脂涂底不佳，引起琼脂与玻璃板脱离，造成抗原或抗体不规则弥散；⑥琼脂浓度低，使其表面渗出水分过多，或缓冲槽内液面过高，导致部分抗原从孔中溢出，形成不规则的沉淀线。

（7）弯度大的沉淀弧　是由于抗原扩散率较低形成的。

（8）平坦弧　是由于抗原扩散率较大形成的。

（9）不对称沉淀弧或两个弯度但又相互连接的沉淀弧　是由于抗原性相同，泳动率不同形成的。

（10）产生分支的沉淀弧　是由于 γ-球蛋白裂解或分次加样的间隔时间长形成的。

（二）对流免疫电泳

1. 原理

本法利用在 pH 8.2 电泳时，处在阳极的抗体的电渗力大于电泳力，故抗体向阴极移动。而处在阴极的抗原则向阳极移动，直至相遇后出现沉淀线。其原理与双向免疫扩散相同，但具有方法简便、快速及一次电泳可以检测多个样品等特点。

2. 方法

① 1%琼脂糖熔化后，置 56℃备用。

② 将玻璃板洗干净后，用 75%乙醇冲洗，于水平台上晾干备用。

③ 吸取琼脂糖铺于玻璃板上（厚约 1.5mm），制成所需大小胶板。

④ 待琼脂糖凝固后，用打孔器成对打孔，孔径 3mm，孔间距 3mm，不同对间距 8mm。

⑤ 在孔中分别加入抗原和抗体，每孔 5μL。

⑥ 电泳 30min（5V/cm）。

⑦ 观察结果：在两小孔间出现沉淀线即为阳性。或压片，干燥和染色保存。

（三）"火箭"免疫电泳

1. 原理

当抗原在电场的作用下通过含有抗体的琼脂凝胶时，将与相应的抗体形成沉淀孤，而未结合的抗原将继续移动至抗原-抗体沉淀弧的先导部分，并溶解复合物再向前移动，直至抗原与抗体反应完毕，便可看到形状似"火箭"的沉淀峰。在抗体量一定时，火箭的高度随着抗原量的增加而增加（图 2-9）。

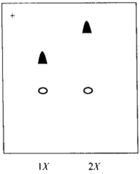


图 2-9 "火箭"免疫电泳

X--抗原浓度

2. 方法

① 将琼脂（2%）巴比妥缓冲溶液（pH 8.2）熔解，冷却至 56℃。

② 试管中，用磷酸盐缓冲的生理盐水将抗血清稀释 5 倍并加温至 56℃。

③ 取 2mL 热琼脂与 1mL 稀释的抗血清混合物，注入已涂布过琼脂膜的载玻片上，保持玻片水平并使其凝结。

④ 在玻片一端打两个小孔，加入已知稀释度的蛋白抗原（必要时可以采用大载玻片，以便有较多的样品孔同时电泳数量较多的蛋白质样品），电泳90～150min（每张玻片约 7.5mA、5～10V/cm）。

⑤ 测量火箭弧峰高的方法是将凝胶板放在有刻度的纸上测量出沉淀峰的高度，误差在 2%～4%。

当火箭呈锐角形状，说明游离抗原全部消失；如电泳时间过短或抗原量过多，沉淀峰前端呈云状，峰的高度并未达到恒定，给测定结果带来误差。实验时，通过调整抗体浓度和抗原浓度，使火箭蜂高达 1～5cm 为宜。

（四）双向免疫电泳

1. 原理

双向免疫电泳又称交叉免疫电泳。它是将蛋白质抗原在琼脂糖凝胶中相互垂直的两向电泳。第一步将抗原在适宜 pH（一般为 pH8.6）的琼脂糖中进行各组分的分离，第二步使抗原进入含有抗血清的琼脂糖中，当抗原抗体相遇时出现弧形沉淀峰，第二向的每一个沉淀峰表示一种抗原成分，峰面积与抗原量成正比，而与琼脂糖中抗体的含量成反比。该法比经典的免疫电泳优越，有较好的分辨率，可用于样品纯度的鉴别和样品组分的定量分析。

2. 方法

（1）第一向电泳　将 15mL 1%琼脂溶液（50℃）倒在水平台上的玻璃板（90mm×110mm）上，待其凝固后，切去边缘 5mm 的凝胶，在剩下的 80mm×100mm×1.5mm 的凝胶板上，平均分成 4 份胶条（每条 20mm × 100mm ×

1.5mm)，在距阴极一边 10mm 处打 4 个孔穴（直径为 2.5mm）。加样后进行电泳，电场强度为 8～10V/cm，电泳后可作第二向电泳。

（2）第二向电泳　第一向电泳后，将其中一条胶条用刀片移到一块涂底的玻璃板（100mm×100mm）上，放在水平台上。将 12mL 含抗体的琼脂凝胶倒在空白部分，待凝固后移到电泳槽上，凝胶通过 100mm 宽的滤纸与缓冲液相通，在 1～2V/cm 的电场强度下，电泳 16～20h（小于 20℃）。电泳完毕，凝胶板的后处理同前。

（3）定量分析　用同样的参考血清和电泳操作，测定沉淀峰所包围的面积，并将该面积与参考抗原形成的相应沉淀面积作比较，即可对各抗原进行定量分析。通过沉淀峰底部最宽处画下基线，以积分法或测量其高度与宽度的方法，求出峰面积。用此面积与图形中的某个参考物如乙酰化白蛋白和氨基甲酰化转铁蛋白的面积相比较，就能提高定量测定的重复性。该法的最大优点是：对含有多种抗原的样品，经过一次交叉免疫电泳后，即可得到定量分析结果。

第三节　常用中药鉴定举例

1. 甘草

【来源】 本品为豆科植物甘草（*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.）、胀果甘草（*G. inflata* Bat.）或光果甘草（*G. glabra* L.）的干燥根及根茎。

【夹心式 ELISA 鉴定】

（1）材料　取内蒙古赤峰和东北地区 3 种不同产地的甘草、黄果甘草、光果甘草、胀果甘草；其他中药有桃仁、三七、人参、苦参、泽泻、天花粉、没药。

（2）主要仪器　酶标仪（Biotech，ELX800），冷冻干燥机（Christ，ALPHAI-4），高速冷冻离心机（Beckman，20RP52D），电泳及电转移系统，超声波细胞粉碎仪。

（3）试剂　弗氏完全佐剂（G_{IBCO}BRL），活化生物素（sulfo-NHS-LC-Biotin EZ-Link™，PIERCE），硝酸纤维素膜（MILL IPORE），辣根过氧化物酶（HRP）标记羊抗兔 IgG，辣根过氧化物酶标记亲和素，邻苯二胺（OPD），3，3′-二氨基联苯胺（DAB），牛血清白蛋白（BSA）。

（4）鉴定方法

① 抗中药总抗原血清的制备　取甘草的干燥粉末 50mg 于 5mLPBS 中，超声波提取。取上述提取液 1mL 与等体积的弗氏完全佐剂混合乳化后，对家兔皮下进行多点注射。每隔两周加强注射一次，定期测定抗血清效价，待获得最高效价后，收集血清，灭活，－20℃保存备用。

② Western 印迹　取上述样品超声波提取液经 SDS-PAGE 电泳分离后，将

分离胶迅速转移至硝酸纤维素膜上。封闭后，加入1000倍稀释的上述抗总抗原血清10mL，室温反应3h。以含Tween-20的PBS溶液（PBST）充分冲洗后，加入1000倍稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG抗体溶液10mL，室温继续反应1h，充分洗涤加入DAB底物显色。

③ 特异性抗体的制备及标记　以精制的甘草特异性蛋白（RGP）为抗原免疫家兔制备抗血清。取上述血清经硫酸铵盐析、透析，用DEAE-cellulose 52离子交换柱进行离子交换层析精制IgG抗体。取精制IgG抗体30mg，溶于0.1mol/L $NaHCO_3$（pH8.5）溶液2mL中，加入活化生物素3mg，搅拌，室温反应2h，加入甘氨酸60mg终止反应。生物素标记抗体经50%饱和硫酸铵沉淀2次后，沉淀物以2mL PBS溶解，透析后，－20℃保存备用。

④ 夹心式ELISA方法的建立　取10μg/mL anti-RGP抗体100μL于酶标板的各孔中，37℃，放置3h，包被酶标板。经1%BSA封闭后，分别加入系列稀释的RGP（或样品）100μL，37℃，放置1h后，PBST充分冲洗后，分别加入500倍稀释的生物素化anti-RGP抗体100μL，37℃，放置1h。PBST充分冲洗，加入稀释1000倍亲和素化辣根过氧化物酶100μL，反应30min，PBST充分冲洗后，再加入OPD底物显色4min，以2mol/L H_2SO_4终止反应，并于490nm处测其吸光度。

（5）结果

① 特异性抗原成分的鉴定　分别将RGP-1（内蒙古）、RGP-2（赤峰）和RGP-3（东北）3种不同产地的甘草及其他7种中药抗原样品进行SDS-PAGE凝胶电泳和Western印迹分析（图2-10）。

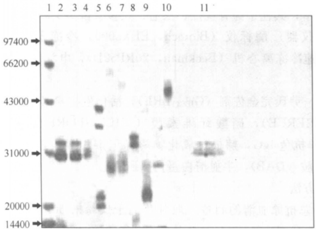


图2-10　甘草等中药的免疫印迹分析

1—标准蛋白；2—RGP-1；3—RGP-2；4—RGP-3；5—桃仁；6—三七；7—人参；8—苦参；9—泽泻；10—天花粉；11—没药

② 抗原成分的分离　取甘草粉末 2g，加 40mL 蒸馏水，在 4℃提取 3 次，合并提取液经 70%硫酸铵盐析，离心，沉淀用少量 PBS 溶解，透析，得粗提物。上述粗提物经 Sephadex G-75、DEAE-cellulose 52、Sephadex G-150 分离，分别以 Lowry 法检测蛋白质含量，以 ELISA 法测定抗原活性，RGP 的纯化倍数为 128 倍（表 2-2）。电泳分析 RGP 的相对分子质量（图 2-11）。

表 2-2　特征抗原的纯化结果

纯化步骤	蛋白含量/mg	抗原活性/IU·mL^{-1}	纯化倍数	纯化步骤	蛋白含量/mg	抗原活性/IU·mL^{-1}	纯化倍数
Extract	360	2.52	1.0	DEAE-cellulose 52	6.51	186	74.5
Salt out	72.8	2.85	1.14	Sephadex G-150	5.02	320	128
Sephadex G-75	8.71	19.1	7.65				

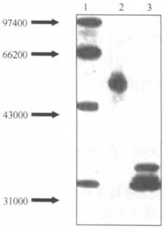


图 2-11　甘草特异性蛋白的电泳图谱
1—标准蛋白；2—天然 RGP 蛋白；
3—变性 RGP 蛋白

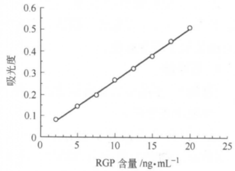


图 2-12　RGP 的标准定量曲线

③ RGP 的标准定量分析与不同中药的提取物中 RGP 含量的测定　以未标记的 anti-RGP 抗体作固相抗体结合 RGP 抗原，以生物素化 anti-RGP 抗体结合酶标亲和素检测其变化（图 2-12），RGP 的浓度在 2～20ng/mL 范围内与结合的辣根过氧化物酶（HRP）活性呈现良好的线性关系（$y-0.0245x+0.0174$，$r=0.999$），$RSD<5.0\%$（$n=6$）。不同品种与产地的甘草超声波提取液中 RGP 含量分别为 17.8～82.7μg/mL（表 2-3）。

表 2-3　不同中药的提取物中 RGP 含量的测定

甘草样品	含量/μg·mL^{-1}	对照中药	含量/μg·mL^{-1}
GR1 *G. uralensis*	79.0	桃仁	未检出
GR2 *G. uralensis*	82.7	三七	未检出
GR3 *G. uralensis*	30.4	人参	未检出

续表

甘草样品	含量/$\mu g \cdot mL^{-1}$	对照中药	含量/$\mu g \cdot mL^{-1}$
GR4 *G. korshinskyi*	17.8	苦参	未检出
GR5 *G. glabra*	25.0	泽泻	未检出
GR6 *G. inflata*	20.4	天花粉	未检出
		没药	未检出

【附】

① CBB染色表明不同中药中存在多种不同蛋白质成分，而RGP-1（内蒙）、RGP-2（赤峰）和RGP-3（东北）等3种甘草样品在32kD和28kD处均呈现了两条相同的主要蛋白带。Western印迹的结果也表明，anti-RGP血清与甘草的蛋白抗原均显良好的反应性，同其他中药不发生交叉反应。证明甘草具有特异性的种属蛋白，利用该蛋白可以进行甘草的免疫学鉴定。

② 电泳分析表明甘草特异性种属蛋白由59kD、32kD和28kD亚单位组成。

③ 不同中药提取物中的RGP含量测定表明，除甘草外的桃仁、三七、人参、苦参、泽泻、天花粉、没药等多种中药均未呈现交叉反应，证明该方法具有良好的灵敏度和专属性。

2. 西洋参

【来源】 本品为五加科植物西洋参（*Panax quinquefolium* L.）的干燥根。

【免疫印迹鉴定】

（1）材料　蛋白分子量标准（上海丽珠东风生物技术公司），西洋参根1（中国药品生物制品检定所9303），西洋参根2（加拿大安大略省Waterford参场），西洋参根3（美国成斯康辛州威州之神公司），西洋参根4（吉林省靖宇县），人参根1（中国药品生物制品检定所9604），人参根2（市售），人参根3（市售），三七1（中国药品生物制品检定所9803），三七2（市售）。

（2）仪器　电泳仪（BIO-RAD，3000Xi，Mini Protean H）。

（3）试剂　丙烯酰胺（Sigma进口分装），亚甲基双丙烯酰胺（SERVA），三羟甲基氨基甲烷（BM），三羟甲基甘氨酸（Sigma），考马斯亮蓝R_{250}（进口分装，中国医药集团上海化学试剂公司），硝酸纤维素膜（0.45μm Phamarcia），羊抗兔IgG-HRP（北京邦定生物医学公司经销），其余试剂均为市售分析纯。

（4）方法

① 原材料处理　将样品分别研成粉末，石油醚-丙酮脱脂，生理盐水-磷酸缓冲液提取蛋白质，饱和硫酸铵溶液盐析，然后用0.1mol/L PBS生理盐水透析，酚试剂法测定蛋白质含量，分装，冻干，4℃保存。

② SDS-PAGE凝胶电泳　采用Lemmli系统，分离胶浓度为12%（或3%），浓缩胶浓度为4%。电泳分3步（均为恒流）：18mA（15min）、24mA

(30min)、34mA (30min)。

③ Tris-Tricine 电泳方法　采用 Tris-Tricine 系统，分离胶浓度为 10%（或 3%），浓缩胶浓度为 4%。电泳分 3 步（均为恒压）：60V（20min）、80V（80min）、120V（30min）。

④ Western 印迹实验方法　电泳完毕，将胶板上的蛋白质水平转移到 NC 膜上，条件是 250mA（80min），NC 膜用 0.01mol/L PBST（含 5%脱脂奶粉）封闭，37℃振荡 1h，然后分别加抗人参或抗西洋参的兔血清（1∶10），37℃振荡 2h，洗涤后再加羊抗兔 IgG-I-IIZP（1∶1000），37℃振荡 1h，最后用 DBA-H_2O_2 系统显色。

（5）结果　SDS-PAGE 电泳指纹图见图 2-13，Tris-Tricine 电泳辅助图见图 2-14，免疫印迹电泳辅助图见图 2-15。

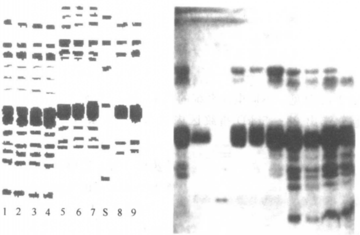


图 2-13　西洋参等中药 SDS-PAGE 电泳指纹图谱

1—西洋参 1；2—西洋参 2；3—西洋参 3；4—西洋参 4；

5—人参 1；6—人参 2；7—人参 3；8—三七 1；9—三七 2；

S—分子质量标准（依次为 14.4kD、20kD、31kD、43kD、66.2kD、97.4kD）

【附】

① 从图 2-13 可见，Panax 属 3 种药材的电泳指纹图可清楚地分为 3 个区。28～58kD 区 3 种药材都极为一致，甚至该区内 55kD 等蛋白分布亦相同，尤其是 28kD 组分均极深染，区带宽度可达 5mm，多数样品该蛋白为 2 个等份，提示该区是 Panax 属共有的特征指纹区。28kD 以下区，西洋参 4 个品种均可见 5 条明显区带，分别为 24kD、21kD、20kD、16kD、12kD，构成西洋参非常特征性的指纹图。该区人参可见 26kD、21kD 及 20kD 区带；三七可见 21kD 及 20kD 区带，均与西洋参交叉，但染色较浅，与西洋参蛋白差别明显。58kD 以上区，除 84kD 亦为三种药材共同区带外，人参尚有 106kD 及 94kD2 条次要区带。

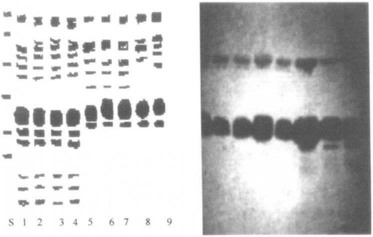
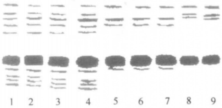


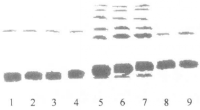
图 2-14　西洋参等中药 Tris-Tricine 辅助图谱

1—西洋参 1；2—西洋参 2；3—西洋参 3；4—西洋参 4；
5—人参 1；6—人参 2；7—人参 3；8—三七 1；9—三七 2；
S—分子质量标准（依次为 14.4kD、20kD、31kD、43kD、66.2kD、97.4kD）

② 从图 2-14 可见，不同电泳系统的结果相似，均显示 3 个区。本系统的优点是清晰地分辨出 28～58kD 指纹区内含有 3～4 条区带，分子质量分别为 55kD、47kD、41kD 及 33kD，亦均为 3 种药材共有。这就从 2 个系统证实该区确为 Panax 属的特征鉴别指纹区。28kD 以下区及 58kD 以上区，区带分布亦与 SDS-PAGE 符合，但特征性反不及前者。



(a) 抗西洋参血清



(b) 抗人参血清

图 2-15　西洋参等中药的 Western 印迹辅助图谱

1—西洋参 1；2—西洋参 2；3—西洋参 3；
4—西洋参 4；5—人参 1；6—人参 2；
7—人参 3；8—三七 1；9—三七 2

③ 从图 2-15 可见，无论抗人参还是抗西洋参血清，Panax 属 3 种药材都发生广泛交叉反应，特别是 28～58kD 区，区带全部交叉，表明三者亲缘关系极密切，进一步从抗原性证实该区为 Panax 属具有专属鉴别意义的指纹区。从抗人参血清印迹显示 58kD 以上区，3 种人参在 84kD、94kD、106kD 有阳性反应，而西洋参及三七阴性，提示这个区的蛋白尽管在 SDS-PAGE 不明显，但仍应认为具指纹特征而予以重视。从抗

西洋参血清印迹显示 28kD 以下区，4 种西洋参在 24kD、21kD、20kD 及 16kD 有阳性反应，而人参、三七阴性，证实该区对西洋参鉴别的重要性。

④ 采用 SDS-PAGE 法为基本方法，经 Tris-Tricine 电泳系统及 Western 印迹辅助验证，表明 Panax 属西洋参、人参及三七蛋白电泳指纹图可分为 3 个特征指纹区，其中 28～58kD 及中间区带构成该属药材共同鉴别区，28kD 以下区西洋参的 4～5 条蛋白组成独特的品种指纹图，而 58kD 以上区则对人参鉴别具有意义。西洋参根与须、四年生与二年生的电泳图也基本一致，市售安纳洋参丸及许氏花旗参茶提取物呈典型西洋参图谱，这些都确证此电泳图是具有指纹鉴别意义的，从而为 Panax 属 3 种药材，尤其是西洋参的专属鉴别提供了一种新的标记手段。

3. 全蝎

【来源】 本品为钳蝎科动物东亚钳蝎（*Buthus martensii* Karsch）的干燥全体。

【免疫电泳鉴定】

(1) 材料　体重 2.5～3.5kg 的健康雄性家兔，东亚钳蝎蝎毒冻干品（取野生东亚钳蝎，以低频电刺激法刺激蝎剑尾采集鲜蝎毒，并置－20℃保存备用，根据不同产地的全蝎，其样品蝎毒分为“昌毒”和“石毒”）。

(2) 仪器　DYY-Ⅲ型电泳仪（北京六一仪器厂），LG-721 型分光光度计（山东高密电子仪器厂），53WB 紫外/可见分光光度计（上海光学仪器厂）。

(3) 样品处理　弗氏完全佐剂配制东亚钳蝎蝎毒抗原，使蝎毒含量为 1.0g/L、2.5g/L 和 5.0g/L，充分振摇，使水相和油相完全混合，不再分层，置 4℃保存。用 15%蝎毒蛋白、鸡血清、羊血清、牛血清、马血清、兔血清及鸡蛋蛋白作为对照蛋白。按常规制备巴比妥-巴比妥钠缓冲液。

(4) 方法

① 抗蝎毒血清的制备及效价测定　将家兔分为两组，分别为试验Ⅰ组、试验Ⅱ组，每组 6 只。Ⅰ组第 1 周注射 200μg/只，分为两次；第 2 周注射 300μg/只，分为 3 次；第 4 周及以后 5 周每周一次性注射 500μg/只。Ⅱ组以Ⅰ组 5 倍的剂量、相同的次数注射。终剂量注射后 5 天采血制备免疫血清，加入叠氮钠或硫柳汞防腐剂，供东亚钳蝎蝎毒的免疫学试验用。从第 5 周开始耳静脉采血 1.0mL/只，分离血清，以琼脂扩散试验测定血清效价，观察抗蝎毒血清的消长情况。

② 东亚钳蝎蝎毒的琼脂扩散试验方法　不同稀释倍数的蝎毒和抗蝎毒血清的琼脂扩散试验，按常规方法制板、打孔，中央孔加入抗蝎毒血清，周围孔加入蝎毒系列溶液，然后置室温下 24h 观察结果。以出现 3 条沉淀线者记“＋＋＋”，出现 2 条者记“＋＋”，出现 1 条者记“＋”，不出现者记“－”。用蝎尾部蛋白及其他蛋白作对照与抗蝎毒血清做琼脂扩散试验，检查抗蝎毒血清的特异性。

③ 东亚钳蝎蝎毒的免疫电泳试验方法　将琼脂板按常规打孔及开槽，用毛

细滴管加入蝎毒样品充满小孔，以 6.0V/cm 电泳 90min，停止电泳。然后加入抗蝎毒血清充满槽内，置铺有湿润海绵垫的平皿中，在 20℃下扩散 24～72h，连续观察结果，至沉淀弧线完全清晰为止。

④ 东亚钳蝎蝎毒的单相辐射免疫扩散试验方法　将用 pH 7.2 PBS 配制的 3%的琼脂融化，各取 20mL 在 56℃水浴中保温，用 PBS 配制 2/5、1/5、1/10、1/20 稀释度的抗蝎毒血清各 20mL，在水浴中加温至 56℃，然后将融化的琼脂与等体积各浓度稀释的抗蝎毒血清混合，倾倒在置水平台上的 12.5cm×8.0cm 的玻璃板上，厚约 1.5mm，每个抗蝎毒血清浓度各制板 3 块。然后用直径 4.0mm 的打孔器在上述制好的各板上均匀打孔 8 个，各孔分别加入 1∶8、1∶16、1∶32，…，1∶1024 稀释的蝎毒液，然后置湿盒内，室温孵育 24h，检查沉淀环并测量其直径。

⑤ 东亚钳蝎蝎毒的对流免疫电泳试验方法　用 pH8.6、0.03mol/L 巴比妥-巴比妥钠缓冲液配制 1%的琼脂，制成琼脂板，用直径 4mm 的打孔器在琼脂板上打孔两排，各 11 个，两排间孔距为 8mm 或 10mm。去掉孔中的琼脂，置电泳槽上，阴极端分别依次加入 1∶8、1∶16、1∶32，…，1∶4096 稀释的蝎毒抗原，阳极端各孔均加入抗蝎毒血清。用双层滤纸搭桥，接通电源，分别在 6V/cm、10V/cm 和 20V/cm 的条件下进行电泳，观察沉淀线出现的时间及特征。

(5) 结果

① 抗蝎毒血清效价测定结果　通过对蝎毒蛋白免疫家兔血清抗体效价的琼脂扩散检测发现Ⅰ组第 6 周琼脂扩散效价 1∶1，以后 3 周均为 1∶2。Ⅱ组第 5 周琼脂扩散效价 1∶2，第 6 周及以后 3 周均为 1∶8。

② 东亚钳蝎蝎毒的琼脂扩散试验结果　见表 2-4。不同稀释倍数的蝎毒和抗蝎毒血清的琼脂扩散试验结果显示，稀释 1∶8192 倍的鲜毒和 1∶4096 倍的冻干毒仍有 1 条沉淀线出现，且重复 3 次结果一致。抗蝎毒血清特异性检查结果发现东亚钳蝎抗蝎毒血清与鸡血清、羊血清、兔血清、牛血清、马血清及鸡蛋蛋白均无沉淀线形成，与蝎尾蛋白形成 1 条不同于蝎毒的沉淀线。

③ 东亚钳蝎蝎毒的免疫电泳试验结果　通过对东亚钳蝎蝎毒与抗蝎毒血清的免疫电泳，结果均观察到 7 条清晰的弯曲沉淀弧和 1 条模糊的平坦弧，重复 3 次，结果一致。

④ 东亚钳蝎蝎毒的单相辐射免疫扩散试验结果　沉淀环经 24h 扩散，各板均出现规律的沉淀环，蝎毒浓度愈高，沉淀环愈大，在抗蝎毒血清的 4 个稀释度中，以 2/5 稀释度形成的沉淀环最清晰，其余抗蝎毒血清稀释度出现的沉淀环则依次变得模糊且沉淀环直径亦依次变大。在蝎毒稀释度中，1∶8、1∶16、1∶32 三个稀释度均形成了 3 个沉淀环，3 个环由内向外依次变淡；1∶64、1∶128、1∶256三个稀释度则形成两环；1∶512、1∶1024 两个稀释度则形成 1 个沉淀

环。蝎毒与抗蝎毒血清各稀释度形成沉淀环的直径经24h扩散后，测定蝎毒及抗蝎毒血清各稀释度形成沉淀环直径的大小，以沉淀环外径大小为准（表2-5）。

表2-4　东亚钳蝎蝎毒琼脂扩散结果

稀释倍数	冻干毒		稀释倍数	鲜　毒
	昌毒	石毒		
20	+++	+++	8	+++
40	+++	+++	16	+++
80	+++	+++	32	+++
160	+++	+++	64	+++
320	+++	+++	128	++
640	++	++	256	++
1280	++	++	512	++
2560	++	++	1024	+
5120	+	+	2048	+
10240	+	+	4096	+
20480	+	+	8192	+
40960	+	+	16384	+

表2-5　东亚钳蝎蝎毒琼脂单相辐射免疫扩散的沉淀环直径　单位：mm

血清稀释浓度	蝎毒稀释浓度							
	1∶8	1∶16	1∶32	1∶64	1∶128	1∶256	1∶512	1∶1024
2∶5	1.80	1.50	1.20	1.00	0.80	0.65	0.50	0.40
1∶5	2.00	1.70	1.40	1.20	1.00	0.80	0.60	0.45
1∶10	2.20	1.85	1.55	1.30	1.05	0.85	0.65	0.50
1∶20	2.40	2.00	1.70	1.40	1.10	0.90	0.70	0.55

⑤ 东亚钳蝎蝎毒的对流免疫电泳试验结果　在各种条件下，分别重复3次，结果均为1∶8，1∶16，1∶32，…，1∶1024各稀释度的东亚钳蝎蝎毒与抗蝎毒血清在180min内出现沉淀线，其中以蝎毒1∶256稀释度、孔距8mm出现沉淀线最早，电压20.0V/cm时为30min，电压10.0V/cm时为50min，电压6.0V/cm时为105min，且出现的沉淀线清晰、端直，位于抗原与血清孔的中间（表2-6）。

表2-6　东亚钳蝎蝎毒对流免疫电泳的沉淀线出现的时间　单位：min

抗原稀释倍数	电压(孔距8mm)/V·cm^{-1}			电压(孔距10mm)/V·cm^{-1}		
	20.0	10.0	6.0	20.0	10.0	6.0
1∶8	70	80	150	75	100	180
1∶16	50	80	140	65	90	160
1∶32	45	75	140	65	90	160
1∶64	40	70	130	55	80	160
1∶128	30	65	120	45	70	140
1∶256	30	50	105	45	65	120
1∶512	85	90	130	90	110	160
1∶1024				—	—	—
1∶4096	—	—	—			

注："—"表示在电泳5h内无沉淀线出现。

〖附〗

① 经 9 周蝎毒抗原免疫注射，两组家兔的血清中均有抗蝎毒蛋白抗体产生，说明蝎毒能够刺激家兔产生特异性抗体。以Ⅱ组抗体效价为高，说明特异性抗体的产生与注射抗原的剂量有关。从第 6 周开始，血清中特异性抗体不随抗原的注射而增高，因此，抗蝎毒血清的制备以抗原注射 6 周为宜。但两组抗蝎毒血清中的特异性抗体效价均不高。

② 琼脂扩散试验结果表明，应用东亚钳蝎蝎毒免疫家兔所制备的血清与蝎毒进行琼脂扩散试验是完全可行的。所产生的沉淀线有 3 条，靠近抗体端的沉淀线粗壮，其余两条细而清晰。随抗原稀释度的提高，3 条沉淀线由抗原端依次消失，且可重复性强。专一性检查除与蝎尾部蛋白产生 1 条不同于蝎毒的靠近抗原的云雾状沉淀线外，与其他对照蛋白均呈阴性反应，表明反应是特异的。因此，应用本试验及其所得结果、抗原及抗蝎毒血清相应的稀释倍数等，能使本项技术成为检测蝎毒的方法之一。

③ 免疫电泳试验结果表明，应用东亚钳蝎蝎毒及免疫家兔所制备的血清在 pH8.6，0.05mol/L 巴比妥-巴比妥纳缓冲液，6.0V/cm，电泳 90min 条件下进行免疫电泳试验是完全可行的。其结果可产生 7 条清晰的弯曲弧和 1 条模糊的平坦弧，证明蝎毒由多组分组成，其中部分组分能有效地刺激家兔产生特异性抗体。应用本试验结果可作为鉴定蝎毒组分的手段之一。

④ 单相辐射免疫扩散试验结果可以说明，应用东亚钳蝎蝎毒免疫家兔所制备的抗血清与蝎毒进行单项辐射免疫扩散试验是完全可行的。所产生的 3 个沉淀环从外向内依次变浓，并随抗原稀释倍数的增加依次消失，沉淀环直径亦随蝎毒稀释倍数的增大而依次有规律地变小，可重复性强，本方法不仅可用于蝎毒的定性鉴定，也可用于蝎毒的定量检测。

⑤ 由对流免疫电泳试验结果可知，应用东亚钳蝎蝎毒免疫家兔所制备的免疫血清与东亚钳蝎蝎毒进行对流免疫电泳试验是完全可行的。其随电压的缩小出现沉淀线的时间延长，随孔距的减小出现沉淀线的时间变短，且随抗原稀释度的变化而发生规律性的变化，在蝎毒 1∶256 和 1∶512 稀释度时出现沉淀线的时间最短，沉淀线清晰、端直、可重复性强。

4. 金牡蛎胶囊

〖来源〗 本品的主要成分为牡蛎精粉。

〖免疫扩散化学鉴定〗

（1）材料 金牡蛎胶囊（深圳海王药业公司），牡蛎及其他类似贝类（栉江珧，翡翠贻贝，文蛤，波纹巴非蛤，河蚬，大獭蛤，毛蚶，均是由中科院南海海洋研究所金启增教授鉴定）。

（2）仪器 伯乐 Xi3000 电泳仪及 MiniproteinⅡ电泳槽，伯乐 3550 酶标仪，

北京六一厂 DYY-Ⅲ43C 水平电泳槽等。

（3）试剂　SDS-DAB，丙烯酰胺，亚甲基丙烯酰胺（Sigma），TEMED，过硫酸铁，NC 膜（Bio-Rad），Tris（BM）。

对照品：系指经纯化后稳定的冻干近江牡蛎（*Ostrea rivularis* Gould）种属特征蛋白（抗原），是免疫学纯品。

（4）方法

① SDS-PAGE 的制备　Tris-HCl 缓冲体系，4%浓缩胶，10%分离胶，恒电流电泳，考马斯亮蓝 R_{250} 染色。

② Western 印迹的制备　SDS-PAGE 后，250mA 下恒电流 80min，将蛋白（抗原）原位转移至 NC 膜上。5%脱脂奶粉-PBST pH7.4 封闭，1∶32 抗牡蛎全血清为一抗，1∶1000 羊抗兔 IgG-HRP 为二抗，DAB-H_2O_2 显色。

③ ELISA 的制备　纯化牡蛎蛋白（即免疫纯对照品）包被酶标板，一抗为 1∶120 纯化牡蛎抗血清，二抗同上，OPD-H_2O_2 显色，酶标仪 490nm 读板。

④ 交叉免疫电泳制备　1%琼脂糖铺板，距边缘 1.0cm 处打直径 3.0mm 孔，加对照品 10μL，恒电流（25mA）电泳 45min，沿孔上方 1.0cm 以外切去，重新倒入含抗血清琼脂糖，转 90°后恒电压第二向电泳 6h。

⑤ 奥氏免疫扩散板制备　1%琼脂糖铺板，沿六角形打孔，中央孔直径 4.0mm，外周孔直径 3.0mm。对照品溶液每隔一孔加入外周孔，稀释度为原液 1∶4、1∶8 及 1∶16。供试品溶液按同样稀释度，依次加入对照品旁的孔。中央孔加检测试药。板置湿盒盖紧，37℃恒温扩散。分别于 12h、24h 及 48h 记录沉淀线。

⑥ 定量免疫电泳板制备　检测试药按 1∶10（体积比）加入 0.01mol/L 巴比妥缓冲液（pH 8.6）中，与预先熔化的 2%琼脂糖共同置 56℃水浴保温，两者等量混合后立即倒板（厚度 1.5mm）。距阴极 1.5cm 处，打一排加样孔，直径 3.0mm，孔距 5.0mm。加样后迅速开始电泳（5min 内），恒电压（5V/cm）电泳 6h。电泳时加盖保湿，槽内温度 20℃左右。电泳液为 0.04mol/L 巴比妥缓冲液 pH 8.6。

（5）结果

① 牡蛎种属特征蛋白的确证

a. 聚丙烯酰胺电泳（SDS-PAGE）法　取鲜牡蛎匀浆，离心 10min（15000r/min），上清液调整至含蛋白 5g/L。依法电泳后，低分子质量蛋白标准曲线 $\lg M=5.19-0.21x$（$r>0.994$，$n=5$）。可见牡蛎蛋白区带约 30 条。与其他 7 种贝类比较，分子质量 110kD、94kD、43kD 可能是贝类共同

蛋白，最深染的 35kD 及 55kD 组带未见于其他贝类，97kD、70kD、15.5kD 及 13.5kD 也为牡蛎独有。

b. 酶免疫印迹法（Western 印迹） 依法转印后的蛋白标准曲线 $\lg M = 5.209 - 0.196x (r=0.994, n=4)$，完全与 SDS-PAGE 一致。观察到各种贝类与牡蛎都有抗原交叉，尤其是毛蚶及翡翠贻贝。用贝类抗原吸收牡蛎抗血清，消除交叉的干扰后，显示牡蛎特征蛋白主要是 55kD，其次是 35kD、17.5kD 及 65～70kD。

c. 糖蛋白电泳法 SDS-PAGE 后，凝胶置过碘酸溶液 8h，再用 Schiff 试剂染色。与其他贝类比较，显示 PAGE 中 110kD、94kD、43kD 及牡蛎独有 15.5kD 均为糖蛋白，其余牡蛎特征蛋白含糖很少。

d. 酶联免疫吸附测定法（ELISA） 依法测定表明，牡蛎对照品 0.5～9.0mg/L 范围内呈线性，P/N 全部大于 6.0（$n=3$），最高为 14。

② 对照品的质量控制

a. 总蛋白含量 用安瓿冻干对照品，双蒸水恢复体积后，福林-酚试剂法测蛋白 7.5g/L（BSA）。

b. SDS-PAGE 法 依法电泳后，粗对照品应主要由 55kD 及 35kD 两区带组成，不允许其他杂蛋白存在。纯品为 55kD 附近 2～3 条复带，后为单一抗原区带。

c. 交叉免疫电泳 依法进行双向电泳，显示单一免疫沉淀峰。

d. 免疫扩散法 依法检测对照品免疫滴度应大于 1∶64。在此稀释度不允许与其他贝类交叉。

③ 牡蛎种属特征蛋白的鉴定

a. 供试品溶液的制备 取胶囊 10 粒，将药粉倾出，用 20mL 0.1mol/L PBS（pH7.2）溶解，室温振动提取 1h，离心 10min（10000r/min），取上清液作供试品溶液。

b. 对照品溶液的制备 取冻干牡蛎种属特征蛋白，每支加 0.1mL 双蒸水，作为对照品溶液。

c. 专属性检测试药溶液的制备 取冻干纯化牡蛎蛋白免疫家兔抗血清，每支加 0.5mL 双蒸水，作为专属性检测试药溶液。

d. 用免疫双扩散（奥氏法） 依法加入上述溶液进行专属性检测（图 2-16）。

④ 牡蛎种属特征蛋白的含量测定 牡蛎种属特征蛋白与峰高的线性关系：取对照品溶液，用 0.1mol/L PBS（pH 7.2）稀释为 1∶2、1∶4 及 1∶8，加入同体积 0.1mol/L 戊二醛，室温放置 30min，每孔加样 10μL，依法电泳测定。以对照品浓度为横坐标，以峰高度为纵坐标，得回归方程：$y=3.52x-1.13$，$r=0.993 (n=5)$。方法学考察见图 2-17 和表 2-7。精密度试验是在同一块板上，分

别加 1∶2 及 1∶4 稀释对照品溶液各 10 点。依法电泳后测定各自峰高。回收率试验是按加样回收试验，取适量对照品溶液，加入已知量的样品溶液中，连同标准曲线，在同一块板上依法测定（表 2-7）。

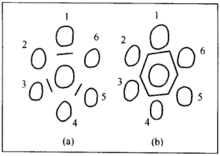


图 2-16　牡蛎精粉免疫双扩散图谱

（a）对照品与试药间沉淀线（1,3,5 孔加不同稀释度对照品）；

（b）供试品与试药间应有沉淀线，且与对照品沉淀线融合（2,4,6 孔加不同稀释度供试品）

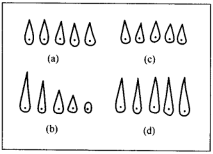


图 2-17　牡蛎特征蛋白含量测定方法学考察

（a）1mg/mL 对照品（$n=5$）；

（b）对照品线性（依次为 4mg/mL，2mg/mL，1mg/mL，0.5mg/mL，空白）；

（c）1∶16 稀释的供试品；

（d）（a）+（c）的回收

表 2-7　牡蛎特征蛋白回收率测定

编号	牡蛎特征蛋白加入量/μg	牡蛎特征蛋白检出量/μg	回收率/%	平均回收率/%
1	10.0	9.6	96	103
2	10.0	10.1	101	
3	10.0	10.2	102	
4	10.0	11.3	113	
5	10.0	10.1	101	

样品测定：在同一块板上，每孔加入供试品溶液或对照品溶液，依法电泳测定（表 2-8）。

表 2-8　金牡蛎胶囊中牡蛎特征蛋白的含量测定结果

批　号	含量/mg・0.5g	*RSD*/%
930803	17.2	5.46
940904	19.4	4.08
941114	16.6	5.00
	17.8±1.22	

注：$n=5$。

【附】

① 对牡蛎特异性种属蛋白的综合分析表明，牡蛎蛋白中分子质量 55kD 等组分，是牡蛎非糖蛋白中含量最大、抗原性最强的组分。该组分与 7 种常见贝类间不交叉，其抗体专属性亦不能被这些贝类中和。由于 ELISA 中，P/N 代表特异

吸附与非特异吸附反应差别，P/N＞5 则试验成立（P/N＞2 为阳性），也反证该组分是牡蛎种属特征蛋白（抗原）。

② 免疫双扩散（奥氏法）对牡蛎种属特征蛋白的专属性检测表明，对照品与供试品和试药间均有清晰沉淀线且尖端相融合（图 2-16）。

③ 含量测定实验表明，牡蛎种属特征蛋白在 5～20μg 之间呈良好线性关系。*RSD* 为 2.80%，且 4 天内稳定。回收率为 103%，*RSD*=6.0%(*n*=5)。并且依法电泳检测的金牡蛎胶囊（粒）含种属蛋白(17.8±1.22)mg/0.5g。

④ 除确证的 55kD 外，牡蛎种属蛋白尚包括 17.5kD、35kD、70kD 等，它们之间与 17.5 近似倍数关系。由于中药制剂中原有蛋白均不同程度水解，所以实际上是以含种属特征抗原的量进行内部质量比较。因此，以蛋白抗原性进行质量控制与用其理化性质进行质量控制而言，是有其合理性的。

⑤"免疫纯对照品"是中药品种特征蛋白进行质量研究中的一个新概念。它完全不同于建立在传统化学纯品基础上的中药标准物质。该方法属蛋白生物活性鉴定。由于免疫反应对抗原抗体最适比例的要求，采用 3 个浓度进行鉴别是必要的。根据反应尚可提示样品特征蛋白含量的范围，以供鉴定参考。

5. 鹿茸

【来源】 本品为鹿科动物梅花鹿（*Cervus nippon* Temminck）的雄鹿未骨化密生茸毛的幼角。

【放射免疫鉴定】

（1）材料　澳鹿茸（澳洲鹿 *C. australicum* 的未骨化幼鹿角，购自北京同仁堂参茸公司），梅花鹿茸，鹿角，鹿角胶（河南老君堂制药有限公司），鹿角镑（购于北京西城区白塔寺药店）。

（2）试剂　雌二醇和睾酮的放射免疫盒由北京北方生物技术研究所提供。雌二醇抗体与雌三醇、睾酮和孕酮均无交叉反应，检测范围为 10～100pg/mL；睾酮抗体与雌二醇、雌三醇和胆固醇均无交叉反应性，监测范围为 0.5～20ng/mL。

（3）方法　将样品粉碎后过 80 目筛，恒重，精密称取 0.5g，置 50mL 烧瓶中，精密加入 30mL 甲醇，回流 1h，冷却。精密吸取上清液 2mL，吹干。测定时加含白蛋白的磷酸缓冲液复溶。

（4）结果　澳鹿茸雌二醇含量为（15.3±1.82)ng/g，是鹿角镑的 8 倍，其次梅花鹿茸雌二醇含量为（11.4±1.26)ng/g，是鹿角镑的 6 倍，两者与鹿角镑相比有极显著性差别（*P*＜0.01）；鹿角和鹿角胶雌二醇含量较低，与鹿角镑相比没有显著性差异（*P*＞0.05）；睾酮的含量低且差别不大，样品之间没有显著性差异（*P*＞0.05）。结果见表 2-9。

表 2-9　鹿茸中雌二醇和睾酮的含量

样　品	测定样品数(n)	雌二醇/ng·g⁻¹	睾酮/ng·g⁻¹
澳鹿茸	3	15.3±1.82	0.44±0.10
梅花鹿茸	3	11.4±1.26	0.23±0.08
鹿角	3	1.73±0.28	0.66±0.02
鹿角胶	3	2.14±0.31	0.11±0.05
鹿角镑	3	1.9±0.26	0.24±0.06

〖附〗

① 梅花鹿茸中雌二醇含量高，与鹿角相比差异明显（明显低）。鹿茸中睾酮的含量不高。鹿茸中雌二醇含量高低可作为评价鹿茸品质的依据之一。

② 放射免疫测定法为测定中药微量物质的一种分析方法，具有高度特异性、灵敏性，使得那些曾认为是无法分析的极微量而又具有重要生物活性物质得以精确定量。

6. 灵芝

〖来源〗 本品为多孔菌科植物赤芝［*Ganoderma lucidum*（Leyss. Ex Fr.）Karst.］或紫芝（*Ganoderma sinense* Zhao，Xu et Zhang）的干燥子实体。

〖免疫活性鉴定〗

（1）材料　灵芝（江苏省农业科学院提供），通过超声波方法将孢子破壁后备用。

（2）方法

① 蛋白质提取及分离　在已破壁灵芝孢子粉中按 3∶1 的比例加入 10mmol/L Tris-HCl缓冲液（pH8.0），冰浴提取 30min，4℃，离心 20min（6000r/min），上清液加两层 Whatman 滤纸滤过，得提取液。

② 蛋白质上样以及层析　将蛋白质初提液加于含有 SephdexG-75 介质的柱（2cm×100cm）中，上样量为柱床体积的 20%。洗脱液为 10mmol/LTris-HCl 缓冲液（pH8.0），流速为 3mL/15min，每管收集洗脱液 3mL，洗脱后，合并处于同一洗脱峰的收集液，在 280nm 和 260nm 处测定吸光度值，计算出相应的蛋白质浓度。

③ 免疫活性的鉴定　利用淋巴细胞转化试验（Lymphocyte transformation test，LTT）检测蛋白的免疫活性，采用 MTT 比色法。实验动物为小鼠。

④ 蛋白质电泳分析　采用 Hames 等方法对分离到的活性蛋白质进行电泳分析。电泳所用分离胶浓度为 10%，浓缩胶浓度为 4.5%。每孔加蛋白量为 5～8μg，电泳时电压为 80V。用考马斯亮蓝 R_{250} 染色。

（3）结果

① 灵芝水溶性全蛋白的凝胶色谱　用 Sephdex G-75 分别对灵芝孢子粉和子

实体水溶性全蛋白进行了分离（图 2-18、图 2-19）。

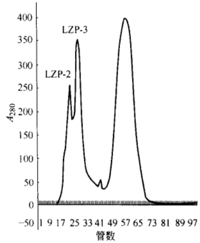


图 2-18　灵芝孢子蛋白的分离曲线

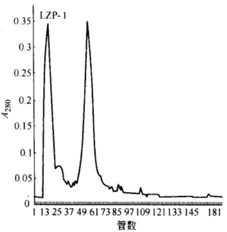


图 2-19　灵芝子实体蛋白的分离曲线

② 灵芝蛋白质的淋巴细胞转化试验（MTT 比色法）　利用小鼠脾淋巴细胞转化实验对分离到的 10 种蛋白质进行活性鉴定，从中找到了 3 种体外具有促进小鼠 T 淋巴细胞增殖活性的蛋白质，分别命名为 LZP-1、LZP-2 和 LZP-3。

LZP-1、LZP-2 和 LZP-3 三种蛋白质体外促进小鼠脾淋巴细胞增殖情况见表 2-10。

表 2-10　灵芝蛋白质体外促进小鼠脾淋巴细胞增殖结果

样　品	剂量/$\mu g \cdot mL^{-1}$	吸光度	增殖率/%
LZP-1	50	0.6050±0.020②	18.2±3.9
LZP-2	50	0.7217±0.016②	41.3±3.1
	5	0.5933±0.009②	17.1±1.8
LZP-3	50	0.7100±0.025②	38.7±4.8
	5	0.5667±0.048①	10.8±9.3
空白		0.5117±0.016	

① $P<0.05$；② $P<0.01$（与空白组比较）。

③ 活性蛋白质 SDS-PAGE 分析　利用 SDS-PAGE 方法对这 3 种具有生物活性的蛋白质（LZP-1、LZP-2 和 LZP-3）进行了鉴定（图 2-20）。

【附】

① 用 Sephdex G-75 分别对灵芝孢子粉和子实体水溶性全蛋白进行了分离，分离到 4 种及 6 种蛋白质。其中有 3 种蛋白质（LZP-1、LZP-2 和 LZP-3）具有体外促进小鼠脾淋巴细胞增殖的作用。LZP-1 来自于灵芝子实体，LZP-2 和 LZP-3 来自于灵芝孢子粉。从分离的结果来看，灵芝孢子粉和子实体水溶性全蛋

白中的蛋白质种类相对较少。从测定结果来看，灵芝孢子粉和子实体中的水溶性全蛋白含量差异较大，相对于孢子粉来说，子实体中的水溶性全蛋白含量仅为前者的10%左右（图 2-18，图 2-19）。

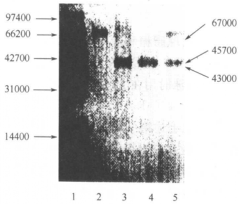


图 2-20 灵芝蛋白质 SDS-PAGE 电泳图谱

1—蛋白质分子标记；2—LZP-1（67000）；3—LZP-2（43000）；4—LZP-3（45700）；5—灵芝蛋白

② 利用 SDS-PAGE 方法对这 3 种具有生物活性的蛋白质（LZP-1、LZP-2、LZP-3）的鉴定表明，3 种蛋白质在 10%的分离胶中均呈现出一条均一的蛋白质条带，对应的相对分子质量分别为 67000、43000 和 45700，是灵芝的鉴别特征。子实体和孢子粉中的蛋白质成分也可能存在着较大的差异（它们在分子量大小上存在着一定的差异）。

③ 子实体中的 6 种蛋白质组分中只有一种组分（LZP-1，其相对分子质量大小为 67000）可以于体外促进小鼠脾淋巴细胞的增殖，但是其对 T 淋巴细胞的增殖率（18.2%）相对于孢子粉中的两种具有刺激 T 淋巴细胞增殖作用的活性蛋白质（LZP-2、LZP-3）要低。LZP-2 和 LZP-3 对体外小鼠脾淋巴细胞的增殖有显著的促进作用，且增殖活性可能与使用浓度呈现出剂量依赖效应。

7. 蛇毒

【来源】 本品为蝰科动物五步蛇［*Agkistrodon acutus*（Güenther）］等的毒蛋白。

【交叉免疫电泳鉴定】

（1）材料 五步蛇（*Agkistrodon acutus*）、白眉蝮蛇（*Agkistrodon piscinuous*）、黑眉蝮蛇（*Bothrop atrox*）、竹叶青蛇（*Trimeresurus gramineus*）和烙铁头（*Trimeresurus gracilis*）5 种蛇的蛇毒。均先配成 30mg/L 的水溶液，使用前用水稀释成所需要的浓度。

（2）仪器 DY-W_2 型电泳仪。

（3）试剂　抗蝮蛇毒血清（上海生物制品研究所生产）；琼脂糖（中国科学院生物物理所生化厂出品）；pH8.81，离子强度为0.02和0.1的巴比妥酸钠-盐酸缓冲液；0.25%氨基黑10B的甲醇、醋酸和水（4∶1∶4）混合液；脱色液[由甲醇、醋酸和水（5∶2∶15）配成]；洗涤液（0.9%氯化钠溶液）。

（4）方法

① 琼脂糖溶液的制备　取琼脂糖和缓冲溶液以8∶1（mg∶mL）混合，置三角烧瓶中水浴上加热使之融化，制成0.8%琼脂糖缓冲溶液，60℃左右供第一方向电泳时备用；第二方向电泳时用在上述备用的琼脂糖溶液中加入抗蝮蛇毒血清，抗体与琼脂糖溶液按2.5∶1（μL∶mL）混合。

② 琼脂糖胶的制备　吸取上述第一方向电泳备用液6mL趁热置于水平放置的玻璃板（8cm×8cm）上，使之成为均匀胶层，待冷却凝结后备用。

③ 电泳　距胶板一端1.5cm处挖一圆孔，加入蛇毒溶液，加少量氨基黑溶液作电泳标志，电压选用8～10V/cm进行电泳，待标记移到另一端为止。然后离边缘2～2.5cm处沿蛇毒分离方向（即电泳方向）切割胶层，去掉不含蛇毒部分琼脂糖胶层，再铺上第二方向电泳的琼脂糖溶液备用液。待冷却凝结后，换成与原来垂直方向，在电压1～3V/cm下电泳24h反应结束。

④ 着色　电泳完毕后，取出琼脂糖胶片，洗去多余的试剂，然后在着色溶液中浸泡1h，脱色，将凝胶片取出贴在滤纸上，自然晾干后保存。

（5）结果　电泳电压第一方向选用8～10V/cm，第二方向选用1～3V/cm，琼脂糖溶液中抗蝮蛇毒血清用量2.5∶1（μL∶mL），对合适浓度的白眉蝮蛇毒（30μg）、黑眉蝮蛇毒（30μg）、五步蛇毒（30μg）、烙铁头蛇毒（45μg）和竹叶青蛇毒（45μg）分别进行琼脂糖胶层上电泳（图2-21、图2-22、图2-23、图2-24、图2-25）。

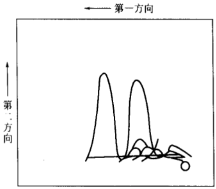


图2-21　抗蝮蛇毒血清与白眉蝮蛇毒交叉免疫电泳图谱

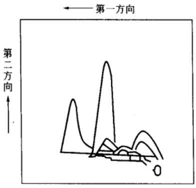


图2-22　抗蝮蛇毒血清与黑眉蝮蛇毒交叉免疫电泳图谱

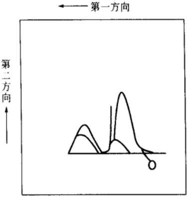


图 2-23 抗蝮蛇毒血清与
五步蛇毒交叉免疫电泳图谱

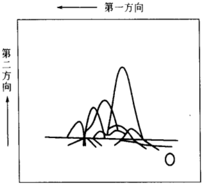


图 2-24 抗蝮蛇毒血清与
烙铁头蛇毒交叉免疫电泳图谱

【附】

① 五种蛇毒与抗蝮蛇毒血清反应所得到的交叉免疫电泳因有明显差异，其中包括峰形、峰数目、出峰相对位置、各峰间高度比等都各不相同，即使是白眉蝮蛇和黑眉蝮蛇两种蝮蛇毒，电泳图谱仍有明显区别。蛇毒是由多种蛋白质组成的，故其抗蛇毒血清中含有多种抗体。

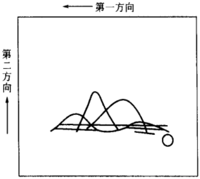


图 2-25 抗蝮蛇毒血清与
竹叶青蛇毒交叉免疫电泳图谱

② 不同蛇毒间有些组分是共有的，如五步蛇毒、烙铁头蛇毒和竹叶青蛇毒均能与抗蝮蛇毒血清反应。由于各种蛇毒共有组分种类不同及各组分相对含量的不同，因此电泳图谱中沉淀线位置及峰相对高度比等各不相同，可用来区分不同的蛇毒。

8. 青蒿

【来源】 本品为菊科植物黄花蒿（*Artemisia annua* L.）的干燥地上部分。

【放射免疫鉴定】

（1）材料 青蒿素（arteannuin），青蒿内酯（artemisilactone）。

（2）方法

① 抗原的制备 利用还原青蒿素的 12 位羟基与 *α*-羟基醋酸乙酯反应，制成青蒿素-12-*O*-醋酸乙酯。将此化合物溶于 95％的乙醇，加 NaOH 使醋酸乙酯部分的酯键水解，制成青蒿素-12-*O*-醋酸，再用混合酸酐法将羧基连接到牛血清白蛋白的氨基上，制成青蒿素-12-*O*-醋酸-牛血清复合物。每分子牛血清白蛋白约连接 15 个分子的青蒿素。

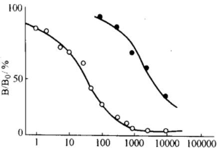


图 2-26　脱氧青蒿素、青蒿内酯与抗青蒿素血清的交叉反应曲线图
○ 脱氧青蒿素；● 青蒿内酯；
B—含待测抗原的抗原-抗体放射性计数率；B_0—含待测抗原的最大抗原-抗体放射性计数率

② 抗体的制备及鉴定　将青蒿素-12-*O*-醋酸-牛血清复合物溶于生理盐水，与等体积的弗氏完全佐剂混合，制成 2mg/mL 的抗原复合物，肌内注射免疫绵羊。每只注射抗原复合物 4mg。3 周后加强注射 1 次，以后每月注射 1 次，每次加强免疫后 7～10 天检测血清抗体。检测发现，初次免疫后第 8 周已产生抗青蒿内酯抗体，滴度约为 1800。继续加强注射 6 次，未见滴度明显增向。当固定抗血清量（1∶500 稀释），加入不同量^{3}H-双氢青蒿素时，抗原与抗体的结合反应呈饱和性，计算得抗体平均亲和常数为 0.83×10^{10} L/mol。在抗血清为 1∶1000 稀释、^{3}H-双氢青蒿素为 7000dpm 时，加入不同量的非标记青蒿内酯，标准竞争曲线如图 2-26。由图可见测定灵敏度约为 2～3ng。脱氧青蒿素与青蒿内酯的交叉反应仅为 1%，如图 2-26 右侧曲线所示。

③ 药物动力学测定　狗静脉注射青蒿素（4mg/kg，14mg/kg）后用上述放射免疫方法测定其血药时程，证明为线性单室动力学模型。药物动力学参数平均为：$K_e=0.028\text{min}^{-1}$，$t_{1/2}=26.5\text{min}$，$V_d=1.55\text{L/kg}$，$CL=2.33\text{L/(h}\cdot\text{kg)}$。

【附】　该方法对青蒿中的主要成分青蒿素及活性衍生物的抗疟官能团-双氧桥结构有特异性，对无此官能团的脱氧青蒿素交叉反应很小（1%），可以用于青蒿的鉴定。

参　考　文　献

1　朱立军等．免疫学常用实验方法［M］．北京：人民军医出版社，2000

2　杨汝德等．生物药物分析与检验［M］．2002

3　白钢，曹学琳，杨文博等．甘草的免疫学鉴定方法研究．中药新药与临床药理［J]，2000，5（11）：164～166

4　俞瑜，吴谦，杨燕军．免疫印迹技术在参属药材鉴别中的应用．中药材［J]，1999，22（11）：559～562

5　俞瑜，吴谦，杨燕军等．Panax 属西洋参、人参及三七的蛋白电泳指纹鉴别．河北农业技术师范学院学报［J]，1995，9（4）：12～16

6　张继东，房海，陈翠珍等．东亚钳蝎蝎毒蛋白的免疫学研究．中药新药与临床药理［J]，1996，7（1）：31～34

7　吴谦，梁艺英，严明达等．金牡蛎胶囊免疫化学鉴别及含量测定的研究．海军医高专学报

[J]，1999，21（1）：18～19

8 罗方成，李志强，凌云．鹿茸中雌二醇和睾酮含量的测定．药物生物技术［J］，2002，9（3）：150～152

9 叶波平，王庆华，周书进等．灵芝蛋白的分离及其免疫活性研究．上海免疫学杂志［J］，1990，10（3）：177～179

（白根本，苏民，陆景珊，张贵君，李仁伟）

第三章　电泳鉴定法

中药主要来源于动物和植物，每种生物类中药都含有能够反映其特征的特异性成分，如蛋白质、多肽和酶类等，即这些活性物质在不同的中药中具有显著性差异或特异性。用电泳分析技术和手段，通过比较它们的特异性，可以对中药进行有效的鉴定。

第一节　概　　述

电泳鉴定法是指带电荷的供试品（如蛋白质、核苷酸等）在惰性支持介质（如纸、醋酸纤维素、琼脂糖凝胶、聚丙烯酰胺凝胶等）中，于电场的作用下向其对应的电极方向按各自的速度进行泳动，使组分分离成狭窄的谱带，用适宜的检测方法记录其电泳谱带图谱或计算其含量（%）的方法。中药鉴定常用的电泳方法有纸电泳法、醋酸纤维素薄膜电泳法、琼脂糖凝胶电泳法、聚丙烯酰胺凝胶电泳法、毛细管电泳法。下面将中药常用的电泳鉴定方法原理简介如下。

一、纸电泳法

1. 仪器装置

包括电泳室及直流电源两部分。较常用的是水平式电泳装置（图 3-1），它包括 2 个电泳槽（A）和一个可以密封的玻璃（或相应材料）盖（B）；两侧的电泳槽均用有机玻璃（或相应材料）板（C）分成两部分；外格装有铂电极（D，直径 5～8mm）；里格为可放滤纸（E）的有机玻璃电泳槽架（F），此架可从槽中取出；两侧电泳槽（A）内的铂电极（D）经隔离导线穿过槽壁与外接电泳仪电源相连。

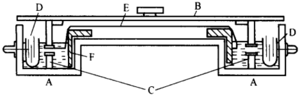


图 3-1　水平式电泳装置

电源为具有稳压器的直流电源。常压电泳在 100～500V，高压电泳在 500～10000V。

2. 电泳试剂

枸橼酸盐缓冲溶液（pH3.0）：取枸橼酸（$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$）39.04g 与枸橼酸钠（$C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$）4.12g，加水 4000mL，使溶解。

3. 操作方法

（1）滤纸　取色谱滤纸置 1mol/L 甲酸溶液中浸泡过夜，次日取出，用水漂洗至洗液的 pH 值不低于 4，置 6℃烘箱烘干，备用。可按需要裁成长 27cm、宽 18cm 的滤纸，或根据电泳槽的大小裁剪，并在距长度方向一端 5～8cm 处划一起始线，每隔 2.5～3cm 处做一记号备点样用。

（2）点样　有湿点法和干点法两种。

湿点法：是将裁好的滤纸全部浸入枸橼酸盐缓冲溶液（pH3.0）中，湿润后，取出，用滤纸吸去多余的缓冲溶液，置电泳槽架上，使起始线靠近阴极端，将滤纸两端浸入缓冲溶液中，加供试品溶液，每点 10μL，共 3 点，并留 2 个空白位置。

干点法：是将供试品溶液点于滤纸上，吹干，再点，反复数次，直至点完规定量的供试品溶液，然后用喷雾器将滤纸喷湿，点样处最后喷湿，本法适用于稀的供试品溶液。

（3）电泳　于电泳槽中加入适量电泳缓冲溶液，浸没铂电极，接通电泳仪稳压电源挡，调整电压梯度为 18～20V/cm，电泳 1.5～2h，取出，立即吹干，置紫外光灯（254nm）下检视，用铅笔划出斑点的位置。

（4）含量测定　剪下供试品斑点和与斑点位置面积相近的空白滤纸，剪成细条，分别置试管中，各精密加入 0.01mol/L 盐酸溶液 5mL，摇匀，放置 1h，用 3 号垂熔玻璃漏斗滤过，也可用自然沉降或离心法倾取上清液，按各药品项下的规定测定吸光度，并按吸收系数计算含量。

二、醋酸纤维素薄膜电泳法

1. 仪器装置

电泳室及直流电源同纸电泳。

2. 电泳试剂

（1）巴比妥缓冲溶液（pH8.6）　取巴比妥 2.76g、巴比妥钠 15.45g，加水溶解使成1000mL。

（2）氨基黑染色液　取 0.5％的氨基黑 10B，溶于甲醇 50mL、冰醋酸 10mL、水 40mL 的混合液中。

（3）漂洗液　取乙醇 45mL、冰醋酸 5mL、水 50mL，混匀。

（4）透明液　取冰醋酸 25mL，加无水乙醇 75mL，混匀。

3. 操作方法

（1）醋酸纤维素薄膜　取醋酸纤维素薄膜，裁成 2cm×8cm 的膜条，将无光泽面向下，浸入巴比妥缓冲溶液（pH8.6）中，待完全浸透，取出夹于滤纸中，轻轻吸去多余的缓冲溶液后，将膜条无光泽面向上，置电泳槽架上，经滤纸桥浸入巴比妥缓冲溶液（pH8.6）中。

（2）点样与电泳　于膜条上距负极端 2cm 处，条状滴加蛋白质含量约 5%的供试品溶液 2～3μL，在 10～12V/cm 电位梯度下电泳。电泳谱带距离以 4～5cm 为宜。

（3）染色　电泳完毕，将膜条取下浸于氨基黑染色液中，2～3min 后，用漂洗液浸洗数次，直至脱去底色为止。

（4）透明　将洗净并完全干后的膜条浸于透明液中 10～15min，取出平铺于洁净的玻璃板上，干后即成透明薄膜，可于分光光度计上测定和作标本长期保存。

（5）含量测定　一般采用洗脱法或扫描法，测定各蛋白质组分的相对含量（%）。

① 洗脱法　将洗净的膜条用滤纸吸干，剪下供试品溶液各电泳图谱的电泳谱带，分别浸于 1.6%的氢氧化钠溶液中，振摇数次，至洗脱完全，于一定波长下测定吸光度。同时剪取与供试品膜条相应的无蛋白部位，以空白作对照。先计算吸收值总和，再计算各蛋白质组分所占比率（%）。

② 扫描法　将干燥的醋酸纤维素薄膜用色谱扫描仪通过反射（未透明薄膜）或透射（已透明薄膜）方式在记录器上自动绘出各蛋白质组分曲线图，横坐标为膜条的长度，纵坐标为吸光度，计算各蛋白质组分的含量（%）。

三、琼脂糖凝胶电泳法

1. 仪器装置

电泳室及直流电源同纸电泳。

2. 电泳试剂

（1）醋酸-锂盐缓冲溶液（pH3.0）　取冰醋酸 50mL，加水 800mL 混合后，用氢氧化铁调节 pH 值至 3.0，再加水至 1000mL。

（2）甲苯胺蓝溶液　取甲苯胺蓝 0.1g，加水 100mL 使溶解。

3. 操作方法

（1）制胶　取琼脂糖约 0.2g，加水 10mL，置水浴中加热使溶解完全，加温热的醋酸-锂盐缓冲溶液（pH3.0）10mL，混匀，趁热将胶液涂布于大小适宜（2.5cm×7.5cm 或 4cm×9cm）的玻璃板上，厚度约 3mm，静置，待凝胶结成无气泡的均匀薄层，即得。

（2）标准品溶液及供试品溶液的制备　照各药品项下规定配制。

（3）点样与电泳　在电泳槽内加入醋酸-理盐缓冲溶液（pH3.0），将凝胶板置于电泳槽架上，经滤纸桥浸入缓冲溶液。于凝胶板负极端分别点样 1μL，立即接通电源，在电压梯度约 30V/cm、电流强度 1～2mA 的条件下，电泳约 20min，关闭电源。

（4）染色与脱色　取下凝胶板，用甲苯胺蓝溶液染色，用水洗去多余的染色液至背景无色为止。

四、聚丙烯酰胺凝胶电泳法

1. 仪器装置

通常由稳流电泳仪、圆盘电泳槽或平板电泳槽组成。其电泳室有上、下两槽，每个槽中都有固定的铂电极，铂电极经隔离电线接于电泳仪稳流挡上。

2. 电泳试剂

（1）溶液 A　取三羟甲基氨基甲烷 36.6g、四甲基乙二胺 0.23mL，加 1mol/L 盐酸溶液 48mL，再加水溶解并稀释至 100mL，置棕色瓶内，在冰箱中保存。

（2）溶液 B　取丙烯酰胺 30.0g、次甲基双丙烯酰胺 0.74g，加水溶解并稀释至 100mL，滤过，置棕色瓶内，在冰箱中保存。

（3）电极缓冲溶液（pH8.3）　取三羟甲基氨基甲烷 6g、甘氨酸 28.8g，加水溶解并稀释至 1000mL，置冰箱中保存，用前稀释 10 倍。

（4）溴酚蓝指示液　取溴酚蓝 0.1g，加 0.05mol/L 氢氧化钠溶液 3.0mL 与 90%乙醇 5mL，微热使溶解，加 20%乙醇制成 250mL。

（5）染色液　取 0.25%（2.5g/L）考马斯亮蓝 R_{250}溶液 2.5mL，加 12.5%（125g/L）三氯醋酸溶液至 10mL。

（6）稀染色液　取上述染色液 2mL，加 12.5%（125g/L）三氯醋酸溶液至 10mL。

（7）脱色液　7%醋酸溶液。

3. 操作方法

（1）制胶　取溶液 A2mL，溶液 B5.4mL，加脲 2.9g 使溶解，再加水 4mL，混匀，抽气赶去溶液中气泡，加 0.56%过硫酸铵溶液 2mL，混匀制成胶液，立即用装有长针头的注射器或细滴管将胶液沿管壁加至底端有橡皮塞的小玻璃管（10cm×0.5cm）中，使胶层高度达 6～7cm，然后徐徐滴加水少量，使覆盖胶面，管底气泡必须赶走，静置约 30min，待出现明显界面时即聚合完毕，吸去水层。

（2）标准品溶液及供试品溶液的制备　照各药品项下的规定。

（3）电泳　将已制好的凝胶玻璃管装入圆盘电泳槽内，每管加供试品或标准

品溶液 50～100μL，为防止扩散可加甘油或 40%蔗糖溶液 1～2 滴及 0.04%溴酚蓝指示液 1 滴，也可直接在上槽缓冲溶液中加 0.04%溴酚蓝指示液数滴，玻璃管的上部用电极缓冲溶液充满，上端接负极，下端接正极。调节起始电流使每管为 1mA，数分钟后，加大电流使每管为 2～3mA，当溴酚蓝指示液移至距玻璃管底部 1cm 处，关闭电源。

（4）染色和脱色　电泳完毕，用装有长针头并吸满水的注射器，自胶管底部沿胶管壁将水压入，胶条即从管内滑出，将胶条浸入稀染色液过夜或用染色液浸泡 10～30min，以水漂洗干净，再用脱色液脱色至无蛋白谱带凝胶的底色透明为止。

（5）结果判断　将胶条置灯下观察，根据供试品与标准品的谱带位置和色泽深浅程度进行判断。

相对迁移率：供试品和标准品的电泳谱带有时可用相对迁移率（R'_m）进行比较。其计算式如下。

$$\text{相对迁移率}（R'_m）=\frac{\text{进胶端到供试品或标准品谱带的距离}}{\text{进胶端到溴酚蓝谱带的距离}}$$

扫描：将清晰的胶条置双波长薄层扫描仪或凝胶电泳扫描仪中扫描并积分，由各组分的峰面积计算含量（%）。

五、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法分离蛋白的原理是根据大多数蛋白都能与阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠（SDS）按质量比结合成复合物，使蛋白分子所带的负电荷远远超过天然蛋白分子的正电荷，消除了不同蛋白分子的电荷效应，使蛋白按分子大小分离。

1. 仪器与试剂

（1）SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳仪仪器装置　恒压或恒流电源，垂直板或圆盘电泳槽，制胶模具。

（2）30%丙烯酰胺溶液　取丙烯酰胺 60g 与亚甲基双丙烯酰胺 1.6g，加水至 200mL，滤纸滤过，避光保存。

（3）分离胶缓冲溶液　取三羟甲基氨基甲烷 36.3g，加水 70mL，用盐酸调节 pH 值至 8.8，加水至 100mL。

（4）浓缩胶缓冲溶液　取三羟甲基氨基甲烷 6.0g，加水 70mL，用盐酸调节 pH 值至 6.8，加水至 100mL。

（5）电极缓冲溶液　取三羟甲基氨基甲烷 6.0g、甘氨酸 28.8g、十二烷基硫酸钠 1.0g，加水至 1000mL。

2. 操作方法

（1）制胶　用30%丙烯酰胺溶液-分离胶缓冲溶液-20%十二烷基硫酸钠溶液-10%过硫酸铵溶液（新鲜配制）-四甲基乙二胺-水（5.0∶1.5∶0.08∶0.1∶0.01∶5.3）制成分离胶液，灌入模具内至一定高度（剩余体积留作制备浓缩胶用），用水封顶，聚合完毕，倾去水层。再用30%丙烯酰胺溶液-浓缩胶缓冲溶液-20%十二烷基硫酸钠溶液-10%过硫酸铵溶液-四甲基乙二胺-水（0.8∶1.3∶0.025∶0.05∶0.005∶2.4）制成浓缩胶液，灌在分离胶上，插入样品梳（如为圆盘电泳，用水封顶），待浓缩胶液聚合后，小心除去样品梳或水。

（2）对照品和供试品溶液的制备　照各药品项下的规定。

（3）电泳　垂直板电泳，即恒压电泳，初始电压为80V，进入分离胶时调至150～200V，当溴酚蓝迁移至胶底处，停止电泳。圆盘电泳，调节电流使每管8mA。

（4）固定与染色

① 考马斯亮蓝染色　试剂：a. 固定液，称取三氯醋酸5g，加水200mL溶解后，加甲醇200mL，再加水至500mL。b. 染色液，称取考马斯亮蓝 R_{250} 0.5g，加水200mL溶解后，加甲醇200mL与冰醋酸50mL，再加水至500mL。c. 脱色液，取甲醇400mL、冰醋酸100mL，加水至1000mL，充分混合。d. 保存液，取冰醋酸75mL，加水至1000mL，摇匀。固定与染色：电泳完毕后，取出胶片（条），置固定液中30min，取出胶片（条），置染色液中1～2h，脱色至凝胶背景透明后置保存液中。

② 银染色　试剂：a. 硝酸银溶液，取硝酸银0.8g，加水至4.0mL，将此溶液滴加到由0.1mol/L氢氧化钠溶液20mL与25%氨溶液1.5mL组成的混合液中，摇匀，用水稀释至100mL。b. 固定液，取甲醇50mL、37%甲醛溶液54mL，加水至100mL。c. 显色液，取1%枸橼酸溶液2.5mL、37%甲醛溶液270mL，加水至500mL。d. 终止液，取冰醋酸100mL，加水至1000mL。固定与染色：将胶片浸在固定液中至少2h，弃去固定液，用水浸洗至少1h；胶片置1%戊二醛溶液中15min后，用水洗2次，每次15min；胶片置硝酸银溶液中15min后，用水洗3次，每次15min；胶片置显色液中，待各带显出后置终止液中。

（5）计算　用卡尺或用扫描定位法测量溴酚蓝指示剂和蛋白迁移距离（如为圆盘电泳还应测量染色前后胶条长度，垂直板电泳胶片厚度低于1mm，染色前后胶片长度基本不变）。按下式计算相对迁移率。

$$相对迁移率（R'_m）=\frac{蛋白迁移距离}{脱色后胶条长度}\times\frac{脱色前胶条长度}{溴酚蓝指示剂迁移距离}$$

① 分子量　以标准蛋白电泳相对迁移率（R'_m）为横坐标，标准蛋白的分子量对数为纵坐标，进行线性回归，由标准曲线求得供试品的分子量。

② 纯度　取胶片（条），置薄层扫描仪，以峰面积按归一化法计算。

③ 结果判断　供试品主成分迁移率应与对照品迁移率一致。

六、毛细管电泳法

毛细管电泳是以弹性石英毛细管为分离通道，以高压直流电场为驱动力，依据样品中各组分之间淌度和分配行为上的差异而实现分离的电泳分离分析方法。

1. 仪器装置

毛细管电泳的设备主要部件有 0～30kV 可调稳压稳流电源，内径小于 100μm（常用 50～75μm）、长度一般为 30～100cm 的弹性石英毛细管，电极槽，检测器和进样装置。检测器有紫外/可见分光检测器、激光诱导荧光检测器和电化学检测器，前者最为常用。进样方法有电动法（电迁移）、压力法（正压力、负压力）和虹吸法。成套仪器还配有自动冲洗、自动进样、温度控制、数据采集和处理等部件。

毛细管电泳所用的石英毛细管柱，在 pH＞3 的情况下，其内表面带负电，与缓冲溶液接触时形成双电层，在高压电场作用下，形成双电层一侧的缓冲溶液由于带正电而向负极方向移动，从而形成电渗流。同时，在缓冲溶液中，带电粒子在电场作用下，以各自不同速度向其所带电荷极性相反方向移动，形成电泳。带电粒子在毛细管缓冲溶液中的迁移速度等于电泳和电渗流的矢量和。各种粒子由于所带电荷多少、质量、体积以及形状不同等因素引起迁移速度不同而实现分离。

2. 操作方法

（1）毛细管电泳的分离模式　主要有以下几种。

① 毛细管谱带电泳　用于分析带电溶质。为了降低电渗流和吸附现象，可将毛细管内壁涂层。

② 毛细管凝胶电泳　在毛细管中装入单体，引发聚合形成凝胶，主要用于测定蛋白质、DNA 等大分子化合物。另有将聚合物溶液等具有筛分作用的物质，如葡聚糖、聚环氧乙烷，装入毛细管中进行分析，称毛细管无胶筛分电泳，故有时将此种模式总称为“毛细管筛分电泳”，又分为凝胶和无胶筛两类。

③ 胶束电动毛细管色谱　在缓冲溶液中加入离子型表面活性剂如十二烷基硫酸钠，形成胶束，被分离物质在水相和胶束相（准固定相）之间发生分配并随电渗流在毛细管内迁移，达到分离。本模式能用于中性物质的分离。

④ 亲和毛细管电泳　在毛细管内壁涂布或在凝胶中加入亲和配基，以亲和力的不同达到分离目的。

⑤ 毛细管电色谱　是将 HPLC 的固定相填充到毛细管中或在毛细管内壁涂布固定相，以电渗流为流动相驱动力的色谱过程，此模式兼具电泳和液相色谱的

分离机制。

⑥ 毛细管等电聚焦电泳　是通过内壁涂层使电渗流减到最小，再将样品和两性电解质混合进样，两个电极槽中分别为酸和碱，加高电压后，在毛细管内建立了 pH 梯度，溶质在毛细管中迁移至各自的等电点，形成明显谱带，聚焦后用压力或改变检测器末端电极槽储备液的 pH 值使溶质通过检测器。

⑦ 毛细管等速电泳　采用先导电解质和后继电解质，使溶质按其电泳淌度不同得以分离。

以上各模式以①、②、③种应用较多。

(2) 电极槽和毛细管内的溶液为缓冲溶液，可以加入有机溶剂作为改性剂，以及加入表面活性剂作为运行缓冲溶液。运行缓冲溶液使用前应脱气。电泳谱中各成分的出峰时间称迁移时间。胶束电动毛细管色谱中的胶束相当于液相色谱的固定相，但它在毛细管内随电渗流迁移，故容量因子为无穷大的成分最终也随胶束流出。其他各种参数都与液相色谱所用的相同。

(3) 对仪器的要求　所用的仪器为毛细管电泳仪。凡采用毛细管电泳法测定的品种，其所规定的测定参数，除分析模式、检测方法（如紫外光吸收或荧光检测器的波长、电化学检测器的印加电位等）应按照该品种项下的规定外，其他参数如毛细管内径和长度、缓冲溶液的 pH 值和浓度、改性剂添加量、运行电压或电流的大小、运行的时间长短、毛细管的温度等，均可参考该品种项下规定的数据，根据所用仪器的条件和预试验的结果，进行必要的调整。

(4) 系统适用性试验　同高效液相色谱法，按各品种项下的要求，进行预试验，并调节各运行参数使达到规定指标，方可正式测定。

(5) 测定法　同高效液相色谱法。目前毛细管电泳仪的进样精度较高效液相色谱法低，定量分析时以用内标法为宜。

第二节　常用中药鉴定举例

一、含蛋白质类的中药鉴定

1. 蛤蚧

【来源】 本品为壁虎科动物蛤蚧（*Gekko gecko* Linnaeus）除去内脏的干燥体。

【蛋白电泳鉴别】

(1) 材料　蛤蚧、壁虎（*G. chinensis* Gray）、无蹼壁虎（*G. swinhonis* Gunther）、喜山鬣蜥（*Agama himalayana* Steindachner）及疣螈（*Tylottoriton kweichowensis* Fang et Chang）的干燥体。

(2) 试剂配制与凝胶制备　常规配制，分离胶浓度 7.5%，浓缩胶浓度 2.5%，胶板面积 12cm×10cm，胶厚度 1mm。

(3) 方法

① 样品液制备　取蛤蚧、壁虎、无蹼壁虎、喜山蹦蜥及疣螈等去皮后的骨肉各 1g，分别加 4mL 生理盐水浸泡 1h，研磨成匀浆状，转移至 5mL 离心管中，离心 15min（4000r/min），分别取上清液各加入 1/2 量的丙酮，再离心 10min（4000r/min），然后加入等体积 40%蔗糖溶液，小心混匀，置冰箱中备用。

② 电泳　分别取上述样品液各 30μL，注入凝胶样品槽内，加入电极缓冲溶液，并向上槽缓冲溶液中加入 1～2 滴溴酚蓝指示剂示踪，接通电源，电泳开始时电流控制在 10～15mA，样品进入分离胶后加大到 20～30mA，待指示剂行至末端 1cm 时，停止电泳，电泳时间约 2h 左右。

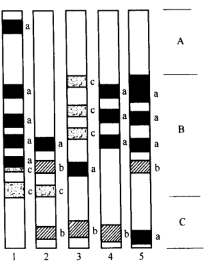


图 3-2　电泳图谱

1—蛤蚧；2—喜山蹦蜥；3—疣螈；4—无蹼壁虎；5—壁虎

③ 固定与染色　电泳完毕后，取出胶板，浸入含有 20%甲醇和 70%醋酸的 0.1%考马斯亮蓝 R_{250} 水溶液中，脱色 1h 左右，再用 20%甲醇和 7%醋酸水溶液脱色至背景清晰为止。

(4) 结果

① 蛤蚧具 7 条谱带。A 区具有 1 条迁移率（R_f）为 0.05 的一级宽带。B 区具 6 条谱带，4 条一级谱带，R_f 分别为 0.32、0.44、0.55、0.62；2 条三级谱带，R_f 分别为 0.67 及 0.74。C 区无带（图 3-2）。

② 壁虎、无蹼壁虎、喜山蹦蜥及疣螈等主要区别特征。A 区均无谱带。C 区均具 1 条谱带，除壁虎为 1 条一级谱带外（R_f=0.94），其他 3 种均为二级谱带（R_f 值：喜山蹦蜥为 0.92，疣螈为 0.86，无蹼壁虎为 0.91）。B 区是谱带集中的区域，壁虎具 4 条谱带（3 条一级谱带，R_f 分别为 0.30、0.43、0.55；1 条二级谱带，R_f 为 0.65）；无蹼壁虎具 3 条一级谱带，R_f 分别为 0.31、0.44、0.53；喜山蹦蜥具 3 条谱带（1 条一级谱带，R_f 为 0.53；1 条二级谱带，R_f 为 0.63；1 条三级谱带，R_f 为 0.74）；疣螈具 4 条谱带（1 条一级谱带，R_f 为 0.66；3 条三级谱带，R_f 分别为 0.29、0.40、0.50）。即 A 区、C 区谱带的有无，B 区谱带数目、等级以及迁移率可作为鉴别特征（图 3-2）。

【附】 电泳谱带分为三级，色深而明显的为一级谱带，色浅但较明显的为二级谱带，色较浅仍可辨者为三级谱带。电泳谱分为 A、B 和 C 三个区域，谱带的

迁移率小于 0.3 为 A 区，大于 0.3、小于 0.74 为 B 区，大于 0.74 为 C 区。

2. 海马

【来源】 本品为海龙科动物线纹海马（*Hippocampus kelloggi* Jordan et Snyder）、刺海马（*Hippocampus histrix* Kaup）、大海马（*Hippocampus kuda* Bleeker）、三斑海马（*Hippocampus trimaculatus* Leach）或小海马（*Hippocampus japonicus* Kaup）的干燥体。

【蛋白高效毛细管电泳鉴别】

（1）材料 线纹海马、刺海马、大海马、三斑海马及小海马等。

（2）仪器 Beckman P/ACE System 5010 高效毛细管电泳分析仪，熔融石英毛细管柱 57cm×75μm（有效长度 50cm），UV 检测器 280nm（Fullerton, CA, USA）。

（3）方法

① 样品的制备 取海马粉末（60 目）0.5g，加入 pH8.5 的 10mmol/L $Na_2B_4O_7$-NaOH 缓冲溶液 2mL，37℃放置 6h，离心 30min（4500r/min），上清液再离心 10min（10000r/min），所得上清液经微孔滤膜器滤过，滤液供分析用。

② 电泳分析条件 缓冲溶液为 200mmol/L $Na_2B_4O_7$-NaOH（pH8.5）；检测波长 280nm；电压 20kV；柱温 25℃；采用压差法进样（压力 85psi[1]，进样时间 5s），分析时间 40min。

（4）结果

图谱分为两个区域：5～15min 的峰簇为指纹图谱区，5 种海马交叉相似，无明显区别。

15～30min 的峰簇：5 种海马明显区别。线纹海马有 t_R=25～26min、t_R=29～30min 的特征峰，前高后低；刺海马有 t_R=16～17min、t_R=17.5～18.5min 的特征峰，两峰高相近；大海马有 t_R=18～19min、t_R=19.5～21min 的特征峰，两峰高相近；三斑海马有 t_R=16～17min、t_R=18～19min 的特征峰，前高后低；小海马有 t_R=15～16min、t_R=16.5～17.5min 的特征峰，两峰高相近。

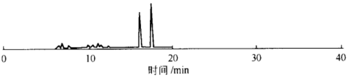
5 种海马混合液：高效毛细管电泳（HPCE）图谱可见 10 个峰，分别与上述 5 种海马特征峰相对应（图 3-3）。

【附】 5种海马的高效毛细管电泳结果显示：利用高效毛细管电泳法鉴别海马的品种，具有明显的专属性。

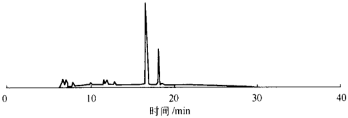
采用 280nm 检测海马蛋白，所得谱图基线平稳，特征峰明显，可以鉴别混合样品中海马的品种或组分。

---

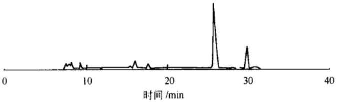
[1] $1psi=1lbf/in^2=6894.76Pa$。



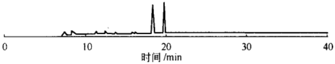
(a) 刺海马



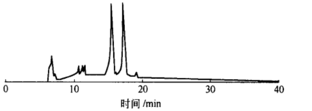
(b) 三斑海马



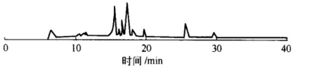
(c) 线纹海马



(d) 大海马



(e) 小海马



(f) 5种海马混合物

图 3-3 海马的 HPCE 图谱

3. 合欢皮

【来源】 本品为豆科植物合欢（*Albizia julibrissin* Durazz.）的干燥树皮。

【蛋白电泳鉴别】

（1）材料　合欢皮，山合欢［*Albizzia kalkora*（Roxb.）Prain］皮。

（2）仪器　DYY-Ⅲ5型稳流稳压电泳仪（北京六一仪器厂），ZYS-100型垂直板电泳槽，800型离心沉淀器。

（3）方法

① 样品的制备　称取合欢皮与山合欢皮各1g，加入稀释4倍的浓缩胶缓冲溶液研磨匀浆，离心15min（2500r/min），取上清液供点样用。

② 电泳图谱的测绘　根据样品谱带的泳动率、形态、着色度绘制电泳图谱，将图谱分为慢速（A）、中速（B）、快速（C）3个区，分别以涂黑、打点、空白、虚线4种符号代表电泳图谱中的一级、二级、三级、四级谱带，并按谱带泳动率大小编号。

（4）结果见表3-1、图3-4。合欢皮蛋白的特征性谱带为 B_7；山合欢皮蛋白的特征性谱带为 A_6、B_4。

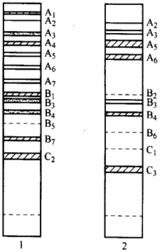


图3-4　合欢皮与山合欢皮的凝胶电泳图谱

1—合欢皮；2—山合欢皮

表3-1　合欢皮与山合欢皮的蛋白凝胶电泳主要谱带泳动率

样品	A_1	A_2	A_3	A_4	A_5	A_6	A_7	B_1	B_2
合欢皮	0.048	0.080	0.15	0.19	0.25	0.31	0.37	0.42	0
山合欢皮	0	0.08	0.13	0	0.19	0.25	0	0	0.42
样品	B_3	B_4	B_5	B_6	B_7	C_1	C_2	C_3	
合欢皮	0.46	0.51	0.56	0	0.64	0	0.72	0	
山合欢皮	0.46	0.51	0	0.59	0	0.67	0	0.79	

【附】 合欢皮与山合欢皮蛋白凝胶电泳图谱在谱带的级别、分布区域及数量上均有明显的区别。

4. 何首乌

【来源】 本品为蓼科植物何首乌（*Polygonum multiflorum* Thunb.）的干燥块根。

【蛋白电泳鉴别】

（1）材料　何首乌，红药子［翼蓼（*Pteroxygonum giraldii* Damm. et Diels）］，朱砂七｛毛脉蓼［*Polyganum cillinerve*（Nakai）Ohwi］｝，白首乌［耳

叶牛皮消(*Cynanchum auriculatum* Royle)],金线吊乌龟[头花千金藤(*Stephania cepharantha* Hayata)],芭蕉(*Musa basjoo* S. etZ.)。以上中药均采自武当山。

(2) 仪器 DYY-2型电泳仪,DYY-21型垂直板电泳槽,80型离心沉淀机。

(3) 鉴别方法与结果

① 样品液制备 取样品粉末1.0g,冰箱内固定1h,加电极缓冲溶液5mL研磨匀浆,离心10min (3000r/min),取上清液0.5mL,加等量40%蔗糖溶液混匀备用。

② 电泳 在储液槽中加入电极缓冲溶液后点样。点样量:何首乌、红药子、朱砂七分别为20μL,白首乌、金线吊乌龟、芭蕉,分别为100μL。上槽接负极,下槽接正极,调节电流6mA进行电泳,样品进入分离胶后,电流调至12mA。以样品朱砂七自身的色素示踪,待泳动至距末端约1cm时,停止电泳,全程4~7h。

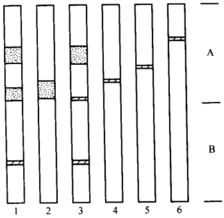


图3-5 何首乌等中药蛋白凝胶电泳图谱
1—何首乌;2—红药子;3—朱砂七;4—白首乌;5—金线吊乌龟;6—芭蕉

③ 染色 剥下凝胶,用12.5%三氯醋酸固定10min,然后置考马斯亮蓝R_{250}染色液中染色1h,再用7%醋酸和20%的甲醇水溶液漂洗,至背景清晰为止。

(4) 结果

何首乌有1条一级谱带,2条三级谱带,2条四级谱带。朱砂七与何首乌相比A区少1条三级谱带。红药子只有1条四级谱带。金线吊乌龟在A区有1条三级谱带。芭蕉在A区有1条三级谱带。白首乌只有1条二级谱带(图3-5)。

【附】 电泳图谱分为A、B两个区域,A区谱带$R_f>0.5$,B区谱带$R_f\leqslant0.5$。按颜色深浅谱带分为四级:色深者为一级谱带,色浅者为二级谱带,色极浅者为三级谱带,扩散带为四级谱带。

何首乌及其混伪品的蛋白质电泳图谱有明显差异的专属性。

5. 羚羊角

【来源】 本品为牛科动物赛加羚羊(*Saiga tatarica* Linnaeus)雄兽的角。

【蛋白电泳鉴别】

(1) 材料 羚羊角,藏羚羊角[藏羚(*Pantholops hodgsoni* Abel)],绵羊角[绵羊(*Ovisaries* L.)],山羊角[山羊(*Capra hircus* L.)]。

(2) 仪器 DYY-ⅢS稳压稳流定时电泳仪(北京六一仪器厂)。

（3）试剂配制与凝胶制备　参照参考文献36。

（4）方法

① 样品制备　称取适量样品粉末，按每克加入10mL稀释2倍的电极缓冲溶液，置乳钵中研磨成匀浆，离心20min（4000r/min），取上清液置冰箱中备用。

② 电泳　安装好胶板后，取样品上清液加入等体积的40%蔗糖液混匀，用微量注射器进样。上槽电极缓冲溶液中加入溴酚蓝指示剂示踪。电泳开始电流控制在15mA，样品进入分离胶后加大到30mA，整个电泳过程维持电流强度不变，待指示剂距前沿约1cm时关闭电源，停止电泳。

③ 染色与脱色　取出胶板，蒸馏水冲洗后放入0.2%考马斯亮蓝R_{250}染色液中，染色1h，然后用含20%甲醇和7%醋酸的脱色液进行脱色，直到背景无色为止。

（5）结果　见图3-6。

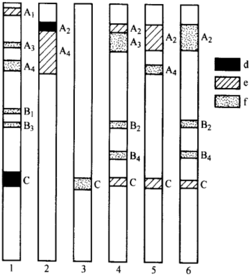


图3-6　羚羊角及其伪品的电泳鉴别图谱

1—羚羊角；2—羚羊角骨塞；3—藏羚羊角；4—大绵羊角；5—山羊角；6—小绵羊角；
d——级谱带；e—二级谱带；f—三级谱带

〖附〗

① 羚羊角与其伪品的来源不同，其谱带的条数、位置、深浅度有着明显的差异。正品羚羊角共有6条谱带，伪品中藏羚羊角有1条谱带，大绵羊角为5条，小绵羊角为4条，山羊角为3条。尤其是羚羊角在C区有1条一级谱带，而伪品无一级谱带。羚羊角A区有二级谱带1条而伪品无，说明不同种生物具有不同蛋白质的特异性和稳定性。

② 羚羊角骨塞共有 2 条谱带，尤其是 A 区有一级谱带 1 条，而羚羊角无。

6. 鹿鞭

〖来源〗 本品为鹿科动物梅花鹿（*Cervus nippon* Temminck）、马鹿（*Cervus elaphus* Linnaeus.）或其他鹿的干燥带睾丸的阴茎。

〖蛋白电泳鉴别〗

（1）材料　梅花鹿鞭，马鹿鞭，驼鹿（*Alces alces* Linnaeus.）的鹿鞭，澳大利亚鹿（*Cervus* sp.）的鹿鞭，驯鹿（*Rangifer farandus* Linnaeus.）的鹿鞭及牛（*Bos taurus domesticus* Gmelin.）的鞭。

（2）仪器　电泳仪 ECP-3000 型，附电泳槽 DYY-Ⅲ28B 型，多用蓄冷循环槽 DYY-Ⅰ型（国产）；高速离心机 20PR-5 型（日本产）。

（3）试剂　丙烯酰胺（进口上海分装），亚甲基双丙烯酰胺（德国，纯度 98.0%），三羟甲基氨基甲烷（美国产），四甲基乙二胺（上海产，纯度不少于 98.0%），考马斯亮蓝 R_{250}（BDH 进口北京分装）。

（4）方法

① 样品制备　取各种鞭类样品，挫取粉末约 0.2g，分别置乳钵中，加电极缓冲溶液 2mL，研磨成糊状，移入离心管中，再用电极缓冲溶液 2mL 冲洗残渣，一并移入离心管中，离心（10000r/min，5℃）15min，倾取上清液，以 0.45μm 的微孔滤膜滤过，滤液作为样品溶液备用。

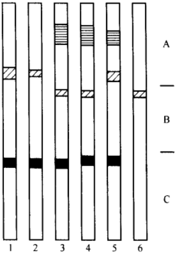


图 3-7　鹿鞭及其混伪品的电泳谱带

1—马鹿鞭；2—梅花鹿鞭；3—驼鹿鞭；4—驯鹿鞭；5—澳大利亚鹿鞭；6—牛鞭

② 聚丙烯酰胺凝胶板制备　pH 8.9，凝胶浓度为 6%的聚丙烯酰胺凝胶，板厚 2mm。

③ 加样　在样品液中加甘油 2 滴，混匀，分别加样 0.2mL，加少量电极缓冲溶液覆盖。

④ 电泳　将上述样品加到凝胶板上、下槽，再分别加入甘氨酸-三羟甲基氨基甲烷（Tris）缓冲溶液，上槽接负极、下槽接正极，接通冷凝水，开始电泳，前 30min 控制电压在 400V，然后加至 600V，电泳约 2h 后停止电泳。取出胶板，置 12.5%的三氯醋酸溶液中固定 1h。

⑤ 染色与脱色　将经 12.5%三氯醋酸固定后的胶板浸置考马斯亮蓝 R_{250} 染色液中约 4h，取出，以水迅速漂洗后，置脱色液中脱色，至背景清晰后取出，观察电泳后的谱带。

（5）结果　见图 3-7。

〖附〗

① 根据电泳中蛋白质的迁移速率不同，可将电泳谱带分为 A、B、C 三个区域。

② 梅花鹿鞭和马鹿鞭各有 2 条谱带，驼鹿（犴）鞭、驯鹿鞭和澳大利亚鹿鞭各有 3 条谱带，牛鞭中有 1 条谱带。梅花鹿鞭和马鹿鞭在 A 区和 C 区各有 1 条谱带，在 B 区没有谱带，并且各谱带的迁移率相同；驼鹿（犴）鞭和驯鹿鞭在 A 区、B 区和 C 区各有 1 条谱带，在 A 区和 B 区各谱带的迁移率相同，C 区驼鹿鞭谱带的迁移率稍大于驯鹿鞭；澳大利亚鹿鞭在 A 区有 2 条谱带，C 区有 1 条谱带，B 区没有谱带；牛鞭只在 B 区有 1 条谱带。

7. 马钱子

〖来源〗 本品为马钱科植物马钱（*Strychnos nuxvomica* L.）或云南马钱（*Strychnos pierriana* A. W. Hill）的种子。

〖蛋白电泳鉴别〗

（1）材料　马钱、云南马钱及山马钱（*S. nuxblanda* Hill）的种子。

（2）试剂配制与凝胶制备　按照常规配制，采用直立平板式电泳装置，胶板面积 12cm×10cm，胶厚度 1mm，分离胶浓度为 7.5%，浓缩胶浓度为 2.5%，pH8.3Tris-甘氨酸缓冲溶液。

（3）方法

① 样品液制备　取马钱子、云南马钱及山马钱胚乳（去掉种皮）各数克，捣碎后，各取 1g 分别加入 Tris-HCl 缓冲溶液，冷浸过夜，充分研磨成匀浆状，转移至 5mL 离心管中，离心 15min（4000r/min），分别取上清液置冰箱中备用。

② 电泳　用 50μL 微量注射器分别取上述已制备好的样品上清液各 20μL，注入已制备好的凝胶样品槽内，加入电极缓冲溶液，并向上槽缓冲溶液中加入1～2 滴溴酚蓝指示剂示踪，电泳开始后，电流控制在 10mA，样品进入分离胶后加大到 25mA，待指示剂行至末端 1cm 时，停止电泳，约需 2h 左右。

③ 固定与染色　电泳完毕，取出胶板，在水中漂洗，放入 0.2% 考马斯亮蓝 R_{250} 染色液中，在 37℃染色 1h，再用含 20%甲醇和 7%HAc 的脱色液在 37℃脱色，直至背景清晰为止。

（4）结果　见图 3-8。

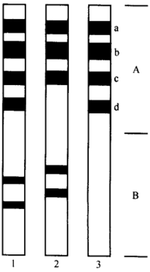


图 3-8　马钱子等电泳图谱
1—马钱子；2—云南马钱；3—山马钱

〖附〗

① 电泳图谱以中心为界（0.60<R_f<0.28）划分为 A、B 两区。马钱子具有 6 条谱带，云南马钱具有 5 条谱带，而山马钱具有 4 条谱带。

② 在 A 区，马钱子、云南马钱及山马钱谱带较为集中和相似。其中 a、b、c 三条主带马钱子、云南马钱及山马钱三者共有，d 带马钱子及山马钱共有，而云南马钱缺少 d 带。在 B 区，马钱子及云南马钱均具 2 条谱带，R_f 值不同，马钱子分别为 0.28 及 0.18，云南马钱分别为 0.32 及 0.24，而伪品山马钱在 B 区无谱带。

8. 阿胶

〖来源〗 本品为马科动物驴（*Equus asinus* L.）的皮，经煎熬、浓缩而成的固体胶。

〖蛋白电泳鉴别〗

（1）材料 阿胶Ⅰ（营口中药厂，批号 891127），阿胶Ⅱ（山东平阴阿胶厂，批号 911 223），杂皮胶Ⅰ（山东东阿阿胶厂，批号 055935），杂皮胶Ⅱ（辽宁省庄河药检所提供）。

（2）方法

① 样品液制备

a. PAGE 法电泳样品的制备：分别取样品各 1g，粉碎，用电极缓冲溶液溶化，使成浓度为 10%的浓液，离心 15min（3000r/min），取上清液备用。

b. SDS-PAGE 法电泳样品的制备：分别取样品各 1g，粉碎，加水 2mL 于水浴加热溶化，离心 15min（3000r/min），取上清液用样品水解液以 1∶3 比例稀释，混匀，至冰箱中水解过夜，备用。

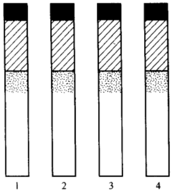


图 3-9 PAGE 电泳图谱

1—阿胶Ⅰ；2—阿胶Ⅱ；

3—杂皮胶Ⅰ；4—杂皮胶Ⅱ

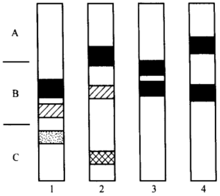


图 3-10 SDS-PAGE 电泳图谱

1—阿胶Ⅰ；2—阿胶Ⅱ；

3—杂皮胶Ⅰ；4—杂皮胶Ⅱ

② 凝胶的制备　参照文献方法进行，PAGE 法凝胶浓度为 7.5%，SDS-PAGE 法凝胶浓度为 7.0%。

③ 电泳　分别取样品液各 80μL，加于凝胶表面，再分别加入指示剂和甘油各 1 滴，接通电源，电流为 8mA/管，于室温下电泳。整个过程维持电流不变，待指示剂电泳至距末端 0.5cm 处，停止电泳。

④ 固定与染色及脱色　将电泳后的凝胶于固定液中固定 30min，浸于染色液中过夜，然后用水冲洗胶条表面，最后于脱色液中反复脱色直至背景清晰为止。

(3) 结果　见图 3-9、图 3-10、表 3-2。

表 3-2　阿胶及杂皮胶电泳谱带数目、分布及主要谱带泳动率

名称	总量	A	B	C	一	二	三	四	泳动率		
									A	B	C
阿胶Ⅰ	3		2	1	1	1		1		0.51　0.57	0.73
阿胶Ⅱ	3		2	1	1	1	1			0.36　0.61	0.89
杂皮胶Ⅰ	2		2		2					0.41　0.47	
杂皮胶Ⅱ	2	1	1		2				0.29	0.49	

【附】

① PAGE 法电泳结果显示，各样品均未见明显的电泳谱带（图 3-9），仅呈现一系列泳动率极相近的区，因此 PAGE 法对这 4 种样品无鉴别意义。

② 根据各样品 SDS-PAGE 法电泳的泳动距离、形态及着色程度绘制其电泳图谱（图 3-10），以完全涂黑、斜线、交叉线及点线 4 种符号分别代表凝胶上的一、二、三、四级谱带，并按泳动率计算公式（R_f＝谱带移动距离/指示剂移动距离）计算出各谱带的泳动率 R_f 值（表 3-2）。阿胶与杂皮胶的电泳图谱不仅谱带数目不同，而且各谱带的 R_f 值及着色程度均有明显差异。阿胶以 C 区谱带为特征，对于不同产地的阿胶，其电泳结果稍有差异，可能与其产地有关。但它们均主要以 C 区为特征，且在 B 区谱带较接近，可视为其共性。

9. 冬虫夏草

【来源】 本品为麦角菌科真菌冬虫夏草菌［*Cordyceps sinensis*（Berk.）Sacc.］寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫上的子座及幼虫尸体的干燥复合体。

【蛋白电泳鉴别】

(1) 材料　冬虫夏草、亚香棒虫草［麦角菌科真菌亚香棒虫草（*C. hawkesii* Gray）寄生在蝙蝠蛾科昆虫幼虫的子座和幼虫尸体的干燥复合体］，凉山虫草［麦角菌科真菌凉山虫草（*C. liangshanensis* Zang，Liu et Hu）寄生在鳞翅目昆虫幼虫的子座和幼虫尸体的干燥复合体］，地蚕［唇形科植物地蚕（*Stachys geobombycis* C. Y. Wu）的干燥根茎］。

（2）仪器　JMDY-WI 精密稳流稳压电泳仪，圆盘电泳槽，LX3-64-01 型离心沉淀器。

（3）试剂　丙烯酰胺溶液，凝胶缓冲溶液，电泳缓冲溶液，染色液，脱色液，样品水解液等试液（配制参照文献）。

（4）方法

① 供试品的制备　取冬虫夏草等各适量（约 0.5g），加水使成 0.1g/mL，研磨成匀浆状，离心 10～15min（2000～2500r/min），取上清液适量，加入样品水解液，按 1∶3 比例混匀，置冰箱中水解过夜。

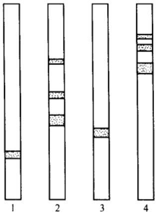


图 3-11　冬虫夏草凝胶电泳图谱

1—亚香棒虫草；2—凉山虫草；3—冬虫夏草；4—地蚕

② 凝胶制备　取丙烯酰胺液-凝胶缓冲溶液-水-1.6%过硫酸铵溶液-四甲基乙二胺（TEMED）按 10∶15∶3.4∶1.5∶0.045 的比例混合均匀，加入凝胶管中，上层慢慢加入少量水，待聚合完毕（出现明显界面）时，即可使用。

③ 电泳　分别取供试品液各 100μL，加入已制好的凝胶柱上，再加溴酚蓝指示液、甘油各 1 滴，用电泳缓冲溶液充满凝胶管。接通电源，电流控制为 8mA/管，于室温下电泳。整个电泳过程保持电流强度不变。当溴酚蓝指示液移至距玻璃管底部 1cm 处，切断电源，取出胶条，浸于染色液中过夜。用水漂洗去胶条表面附着的染料，再于脱色液中，并在室温条件下反复更换脱色液，直至背景清晰为止。

（5）结果　见图 3-11。

【附】

① 冬虫夏草与伪品亚香棒虫草虽都只有一条谱带，但谱带位置明显不同，可使两者相区别。凉山虫草和地蚕则分别具 3 条不同的谱带，与冬虫夏草比更有明显差异。冬虫夏草、亚香棒虫草、凉山虫草的来源相近，外形相似，特别是在外形不完整的情况下难以区别。但三者的电泳图谱各不相同，差异明显。

② 供试品经过水解后，呈多分散状态，使得供试品的电泳谱带有扩散现象，但其主要谱带数目清晰、固定，具鉴别意义。

10. 决明子

【来源】 本品为豆科植物决明（*Cassia obtusifolia* L.）或小决明（*Cassia tora* L.）的种子。

【蛋白电泳鉴别】

（1）材料　决明种子，钝叶决明种子，望江南（*C. occidentalis* L.）种子。

（2）仪器　DYY-Ⅲ28A 型电泳槽（六一仪器厂）。

（3）试剂 配制及凝胶的制备方法可参考《电泳》（李玉民等著）一书。分离胶浓度为10%，浓缩胶浓度为5%，凝胶厚度为1.5mm。

（4）方法

① 样品液制备 各取样品粉末1g，分别加入适量0.05mol/L（pH8.0）的Tris-HCl缓冲溶液，研磨匀浆，离心10min（3500r/min），取上清液备用。

各取1mL上清液，加入等量蛋白质处理液，混匀，沸水溶解，保温2min，放至室温备用。

② 电泳 胶制好后，在上、下槽分别加入电泳缓冲溶液，上槽内所加缓冲溶液高于铂金丝。样品依次在凹槽内加样，加样量为40μL，每槽只加一个样品。通入冷凝水，接通电源。开始控制电压为100V，进入分离胶后调节电压为200V。待样品中所含的溴酚蓝指示剂迁移至距下沿1～1.5cm处停止电泳（电泳时间为4h）。

③ 固定与染色 采用改良考马斯亮蓝G_{250}染色法。固定：剥胶后将凝胶片置于固定液甲醇-水-冰醋酸（5：5：1）中过夜。染色：固定后转入染色液95%乙醇-磷酸-水（1：2：17）（含考马斯亮蓝G_{250}）中，1～2min后即开始出现蛋白谱带，继续显色至蛋白谱带完全出现为止，约需1h。

（5）结果 见图3-12。

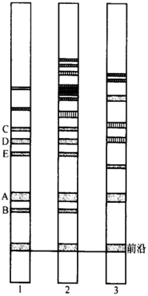


图3-12 决明子电泳图谱
1—钝叶决明子；2—决明子；3—望江南子

【附】 小决明、决明、望江南的种子蛋白质电泳图谱具有明显差异。从谱带数量看，以决明子最多；钝叶决明子、望江南子的谱带数目区别不明显。在电泳图谱中，三种种子都具有A带，染色最深，谱带最宽。B带是望江南子区别于其他两种子的最明显的鉴别特征，其他两种子的电泳谱带中C、D、E带带宽和染色深浅及位置都相同，只是决明子的谱带数目明显多于钝叶决明子。

11. 川贝母

【来源】 本品为百合科植物川贝母（*Fritillaria cirrhosa* D. Don）、暗紫贝母（*Fritillaria unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia）、甘肃贝母（*Fritillaria przewalskii* Maxim.）及梭砂贝母（*Fritillaria delavayi* Franch.）的干燥鳞茎。

【蛋白电泳鉴别】

（1）材料 所用贝母药材样品及来源见表3-3。

（2）仪器与试剂 SCR电泳仪（南京大学仪器厂），夹心式垂直板型电泳槽，凝胶板体积100mm×120mm×1.5mm，日本岛津韶-930型薄层扫描仪。分

离胶浓度 15%，浓缩胶浓度 3%。

表 3-3　贝母药材样品及来源

中文名	拉丁学名	产　地
鄂北贝母	*Fritillaria ebeiensis* G. D. Yu et G. Q. Ji	湖北随州
紫花鄂北贝母	*F. ebeiensis* var. *purpurea* G. D. Yu et P. Li	湖北随州
湖北贝母	*F. hupebensis* Hsiao et K. C. Hsia	湖北建始
太白贝母	*F. taipaiensis* P. Y. Li	湖北五峰
蒲圻贝母(栽培)	*F. puqiensis* G. D. Yu et G. Y. Chen	湖北蒲圻
蒲圻贝母(野生)	*F. puqiensis* G. D. Yu et G. Y. Chen	湖北蒲圻
平贝母	*F. ussuriensis* Maxjm.	吉　林
安徽贝母	*F. anhuiensis* S. C. Chen et S. F. Yin	安徽霍山
裕民贝母(野生)	*F. yuminensis* X. Z. Duan	新疆裕民
裕民贝母(栽培)	*F. yuminensis* X. Z. Duan	新疆裕民
梭砂贝母	*F. delavayi* Franch.	四川
一轮贝母	*F. maximowiczii* Freyn	河北承德
托里贝母	*F. tortifolia* X. Z. Duan et X. J. Zheng	新疆塔城
额敏贝母	*F. meleagroides* Patrin.	新疆塔城
伊贝母	*F. pallidiflora* Schrenk.	新疆霍城
新疆贝母	*F. walujewii* Rgl.	新疆新源县
甘肃贝母	*F. prziwalskii* Maxim. ex Batal.	四川小金县
暗紫贝母	*F. unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia	四川小金县
浙贝母	*F. thunbergii* Miq.	浙江杭州
东贝母	*F. thunbergii* var. *chekiangensis* Hsiao et K. C. Hsia	浙江东阳
小白花贝母	*F. albidoflora* X. Z. Duan et X. J. Zheng	新疆裕民
砂贝母	*F. karelinii* Baker.	新疆塔城

（3）方法

① 样品制备　称取样品 2.5g，加浓缩胶缓冲溶液 5mL，研磨成匀浆，离心 5min（4000r/min），取上清液加等量的样品缓冲溶液，在水浴中煮沸约 2min，置冰箱保存备用。

② 电泳　点样量 50μL，初始电流 15mA，待溴酚蓝指示剂到达分离胶位置时，加大电流 20mA，保持该电流至溴酚蓝指示剂迁移距前沿 1cm 处，关闭电源，取出凝胶板，染色，脱色，固定。

③ 扫描　扫描条件：单波长透射法线性扫描，λ=600nm。

（4）结果　见图 3-13、图 3-14。

【附】

① 各种贝母的蛋白质电泳图谱存在明显的差异，如几种新疆产贝母：新疆贝母、伊贝母、额敏贝母、托里贝母、裕民贝母、小白花贝母、砂贝母等多具有一定的差异。这种差异在原变种与变种之间也反映出来，如鄂北贝母与紫花鄂北贝母、浙贝母与东贝母等，所含蛋白质既具有一定的相似性，又具有明显的

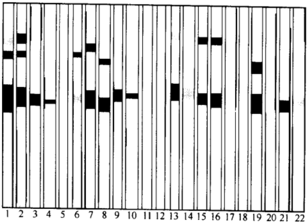


图 3-13　贝母类蛋白质电泳图谱

1—紫花鄂北贝母；2—鄂北贝母；3—湖北贝母；4—太白贝母；5—蒲圻贝母（栽培）；6—蒲圻贝母（野生）；7—平贝母；8—安徽贝母；9—裕民贝母（野生）；10—裕民贝母（栽培）；11—梭砂贝母；12—轮贝母；13—托里贝母；14—额敏贝母；15—伊贝母；16—新疆贝母；17—甘肃贝母；18—暗紫贝母；19—浙贝母；20—东贝母；21—小白花贝母；22—砂贝母

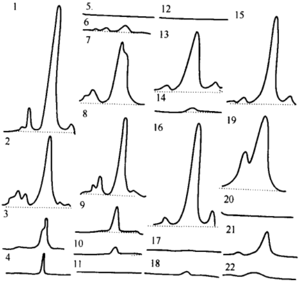


图 3-14　贝母类蛋白质电泳扫描图谱（图中序号同图 3-14）

差异。

② 同种植物栽培品与野生品之间存在差异，如蒲圻贝母及裕民贝母。

③ 20 种贝母药材样品（除未显带者）均且具有一条相似的带，其迁移率 $R_m=0.44\sim0.51$（蛋白质迁移率 $R_m=d_2/d_1$，d_1 为溴酚蓝迁移的距离，d_2 为蛋

白质迁移的距离)。这显示了贝母类药材之间的相关性，表明贝母类药材蛋白质电泳图谱具有一定的稳定性和可靠性。

12. 小茴香

〖来源〗 本品为伞形科植物小茴香（*Foeniculum vulgare* Mill.）干燥成熟的果实。

〖蛋白电泳鉴别〗

（1）材料　小茴香（*Fructus foeniculi*)，蛇床子（*Fructus cnidii*)，莳萝子（*Fructus anethi*)。

（2）方法

① 样品液制备　取纯净的蒙药材适量，加入 Tris-HCl 缓冲溶液，研磨成匀浆，置冰箱中备用。

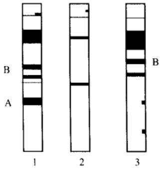


图 3-15　小茴香等的蛋白质电泳图谱

1—莳萝子；2—小茴香；3—蛇床子

② 电泳　取样品上清液加入等体积 40% 蔗糖液，用微量注射器上样。在上槽缓冲溶液中放入 1～2 滴溴酚蓝作指示剂。调节电流至每管 2mA 进行电泳。

③ 脱色　取出凝胶后，放入 0.2% 的考马斯亮蓝 R_{250} 染色液中，在 36℃ 下染色 1h，再用含 20% 甲醇和 7% 醋酸的脱色液在 36℃ 下进行脱色，常更换脱色液，直至背景清晰为止。

（3）结果　见图 3-15。

【附】 3 种中药的蛋白谱带有明显差异（图 3-15)。从谱带数量看，莳萝子有 6 条，小茴香 3 条，蛇床子 4 条，其中 A、B 两带为明显的鉴别特征带，A 带染色最深，呈深蓝色。莳萝子具有 A、B 两条带，而蛇床子只具 B 带，小茴香则两条带皆无。

13. 大黄

【来源】 本品为蓼科植物掌叶大黄（*Rheum palmatum* L.)、唐古特大黄（*Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf.）或药用大黄（*Rheum officinale* Baill.）的干燥根及根茎。

〖蛋白电泳鉴别〗

（1）材料　掌叶大黄及土大黄［河套大黄（波叶大黄）(*R. hotaoense* C. Y. Cheng et C. T. Kao）的干燥根］。

（2）方法

① 样品制备　分别把实验材料捣碎，过 50 目筛，各称取样品粉末 0.5g，分别加入稀释 4 倍的浓缩胶缓冲溶液 4mL，在研钵中研磨匀浆，转移到离心管中，

离心 15min（3500r/min），取上清液置冰箱中备用。

② 电泳　取样品上清液，用微量进样器点样 20μL，在上槽的电极缓冲溶液中加入 2 滴溴酚蓝指示剂示踪。电泳开始时电流控制在 10mA，待样品进入分离胶后电流加大到 20mA，整个电泳过程维持电流强度不变。待示踪指示剂距前沿约 1cm 时停止电泳。

③ 染色　取出胶板，用 0.1% 的考马斯亮蓝 R_{250} 染色，在 37℃ 染色 1h，再用含 20% 甲醇和醋酸的脱色液脱色，反复更换脱色液，直至背景清晰为止。

(3) 结果　见图 3-16。

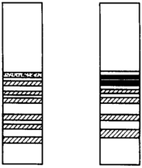


图 3-16　大黄及土大黄电泳图谱

【附】大黄有 7 条谱带，一级谱带 3 条，二级谱带 4 条；土大黄有 7 条谱带，二级谱带 6 条，三级谱带 1 条。两种药材的电泳谱带级别、条数、分布及 R_f 值均有明显差异。

14. 砂仁

【来源】本品为姜科植物阳春砂（*Amonum villosum* Lour.）、绿壳砂（*Amonum villosum* Lour. var. *xanthioides* T. L. Wu et Senjen）或海南砂（*Amonum longiligulare* T. L. Wu）的干燥成熟果实。

【蛋白电泳鉴别】

(1) 材料　阳春砂和山姜［*Alpinia japonica*（Thunb.）Miq.］的种子。

(2) 仪器　BS423 型稳流稳压电泳仪（北京生化仪器厂生产）。

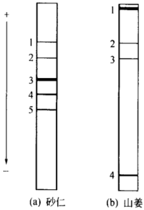


图 3-17　砂仁与山姜种子的蛋白电泳谱图

(3) 试剂　丙烯酰胺（化学纯），亚甲基双丙烯酰胺（化学纯），过硫酸铵（分析纯），四甲基乙二胺（生化试剂），考马斯亮蓝 R_{250}，三羟甲基氨基甲烷等。

(4) 方法

① 样品制备　称取试样 1g，磨碎后加 0.9%NaCl 溶液 10mL，充分研磨，离心 20min（2000r/min），取上清液，放置冰箱中备用。

② 电泳　直立管式凝胶电泳装置。玻璃管长 10cm，内径 0.5cm，分离胶浓度 7.5%，高度 8.0cm，浓缩胶浓度 3.0%，高度 1.5cm。以 pH8.3 的 Tris-甘氨酸缓冲溶液为电极缓冲溶液。取样品溶液加等体积 40%蔗糖溶液，进样，进样量约 0.2mL，以溴酚蓝为指示剂示踪，室温下稳流（40mA）电泳约 2h，电泳后凝胶于 40℃用 0.2%考马斯亮蓝 R_{250} 染色 1h，然后用脱色液（冰醋酸：95%乙醇：水＝1：3：10）脱色。

（5）结果　见图 3-17。

【附】 砂仁共出现 5 条谱带，其中 2 条较深的宽带和 3 条稍浅的窄带；山姜共出现 4 条谱带，其中 1 条较深的宽带和 3 条稍浅的窄带。砂仁第 1 条、第 2 条谱带的迁移率、深浅、宽度与山姜的第 2 条、第 3 条谱带基本相同。

15. 牛蒡子

【来源】 本品为菊科植物牛蒡（*Arctium lappa* L.）的干燥成熟果实。

【蛋白电泳鉴别】

（1）材料　牛蒡子，新疆牛蒡子，木香果实。

（2）仪器　DY-74 型电泳仪，圆盘电泳槽，80-2 型离心沉淀机。

（3）试剂　凝胶浓度为 6.3%；蛋白质染色剂考马斯亮蓝 G_{250} 的配制方法：取考马斯亮蓝 G_{250} 100mg，浓磷酸 100mL，无水乙醇 45mL，加水溶解，稀释至 1000mL。

（4）方法

① 样品液制备　取实验材料 0.5g，加电极缓冲溶液 3mL 研磨成匀浆，转移至离心管中，离心 15min（3000r/min），取上清液 0.5mL 加入 0.05%溴酚蓝示踪指示剂 1～2 滴，混匀，备用。

② 电泳　在上、下储液槽中加入电极缓冲溶液，上储液槽液体高度应超过玻璃管上缘。用微量注射器吸取 30μL 样品液，加到凝胶界面处。上槽接负极，下槽接正极，调节电流按 1mA/管，电泳 2min 后，按 3.5mA/管进行电泳，待示踪指示剂行至距末端 0.5cm 时，关闭电源，全程约需 40min。

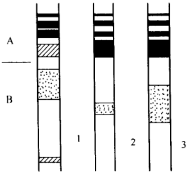


图 3-18　牛蒡子及其混伪品的电泳图谱

1—牛蒡子；2—新疆牛蒡子；3—木香果实；

Ⅰ级带；Ⅱ级带；Ⅲ级带

③ 染色　取下玻璃管，剥出胶条进行染色。

考马斯亮蓝 R_{250} 染色法：将胶条置固定液中固定 10min，然后置染色液中于 90℃水浴染色 10min，再用洗脱液反复洗脱，至背景清晰为止。

考马斯亮蓝 G_{250} 染色法：将胶条置染色液中，室温下染色 30min 即得。

（5）结果　见图 3-18。

【附】

① 牛蒡子及其相似品蛋白质电泳图谱有明显的差异，且同种实验材料在相同条件下，分别用两种染色剂染色，所得电泳谱带相同。

② 3 种实验材料的 PAGE 图谱可区分为 A、B 两个区域，并按颜色的深浅

将谱带分为三级。在A区域内，3种材料所呈现的谱带相似，较显著的差别是牛蒡子的第4条带为二级谱带，而两种相似品的第4条带为一级谱带。在B区域内，牛蒡子有两条带，1条为二级谱带，1条为三级谱带，而两种伪品都只有1条三级谱带。

16. 桃仁

〖来源〗 本品为蔷薇科植物桃［*Prunus persica*（L.）Batsh］或山桃［*Prunus davidiana*（Carr.）Franch.］的干燥成熟种子。

〖蛋白梯度电泳鉴别〗

（1）材料 1号桃仁（山桃的种子去皮），2号桃仁（桃的种子去皮），3号桃仁（桃的种子去皮）。

（2）仪器 DYY-Ⅲ8B电泳仪，DYY-Ⅲ28B电泳槽，HL-1恒流泵，TH-1梯度混合器TGL-16离心机。

（3）方法

① 样品制备 以pH7.4的TE缓冲溶液（0.1mol/L Tris，5mmol/LEDTA）为提取缓冲溶液，将0.5g样品先在研钵中粉碎，加10mL提取缓冲溶液到研钵中，与研磨过的样品混匀，然后倒入干净的玻璃匀浆器中匀浆10min，离心5min（12000r/min），取上清液0.5mL，加入0.4mL 20%的蔗糖水溶液，0.1mL溴酚蓝指示剂，混匀后－70℃冰箱保存，备用。

② 4%～30%的梯度聚丙烯酰胺凝胶的制备

a. 10×Tris-硼酸盐-EDTA缓冲液（TBE）缓冲溶液的配制：10.75g Tris＋0.93g EDTA＋5.04g硼酸定容至100mL，冰箱保存备用。

b. 30%梯度胶储存液的配制：30g丙烯酰胺＋1.5g亚甲基双丙烯酰胺用TBE溶解，定容至100mL，滤过，4℃冰箱保存备用。

c. 4%梯度胶储存液的配制：4g丙烯酰胺＋0.2g亚甲基双丙烯酰胺用TBE溶解，定容至100mL，滤过，4℃冰箱保存，备用。

d. 4%～30%的梯度聚丙烯酰胺凝胶的制备：30%梯度胶储存液8mL＋0.1mL 3%的过硫酸铵水溶液＋4μL TEMED混匀，4%梯度胶储存液8mL＋0.1mL 3%的过硫酸铵水溶液＋4μL TEMED混匀，再分别倒入梯度混合器的2个槽中，打开梯度混合器，将胶灌到DYY-Ⅲ28B电泳槽中，聚合后最上面是4%的胶，网孔最大，最下面是30%的胶，网孔最小，从上往下胶的网孔也越来越小，形成梯度（过硫酸铵和TEMED为催化剂，制胶时如温度较高，它们的用量要减少，如温度较低，则用量需加大）。

③ 电泳 250V预电泳20min，然后每孔上样25μL，250V恒压电泳23h。

④ 染色和脱色 用考马斯亮蓝R_{250}染色液固定染色45min，脱色液脱色至背景无色为止。

(4) 结果 见图 3-19。



图 3-19 桃仁梯度 PAGE 图谱

1—1 号桃仁；2—2 号桃仁；3—3 号桃仁

【附】 利用梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳可以鉴别不同品种的桃仁。

17. 熊胆

【来源】 本品为熊科动物黑熊（*Selenarctos thibetanus* Cuvier）或棕熊（*Ursus arctos* Linnaeus）的干燥胆。

【蛋白电泳鉴别】

(1) 材料 见表 3-4。

表 3-4 12 种熊胆的来源

样品号	来源	产地	鉴定者
1	马来熊(*Helaraclos malayanus*)	四川	邬家林
2	棕熊(*Ursus arclos*)	黑龙江	邬家林
3	棕熊(*U. arclos*)	延边	邬家林
4	棕熊(*U. arclos*)	四川	邬家林
5	黑熊(*Selenarlos chibelanus*)	延边	邬家林
6	黑熊(*S. chibelanus*)	安徽	邬家林
7	黑熊(*S. chibelanus*)	四川灌县养鹿厂	邬家林
8	黑熊(*S. chibelanus*)	四川养麝厂	邬家林
9	商品熊胆粉	云南屏边	邬家林
10	商品熊胆粉	辽宁	邬家林
11	商品天然熊胆	贵阳	邬家林
12	商品天然熊胆	辽宁	纪俊元

注：样品 1～8 均为人工引流熊胆。

(2) 仪器 DYY-Ⅲ2 型稳压流电泳仪（北京六一仪器厂），DYY-Ⅲ27 型圆盘电泳槽（北京六一仪器厂），800 型离心沉淀器（上海手术器械厂）。

(3) 方法

① 样品的制备 分别取上述样品，加蒸馏水，在乳钵内研磨成匀浆，制成浓度为 0.2g/mL 的溶液，离心 10min（3000r/min），取上清液适量，加样品水解液（尿素 21.6g，SDS 0.04g，溶于 40mL 蒸馏水）稀释 3 倍，于冰箱水解过夜。

② 电泳　电流为 8mA/管，染色应过夜。

（4）结果　根据各样品谱带的泳动率（R_f）、形态和着色程度绘制电泳图谱，以完全涂黑 A、斜线 B、交叉线 C 及点线 D 4 种符号分别代表凝胶上的 A 级、B 级、C 级和 D 级谱带（图 3-20）。

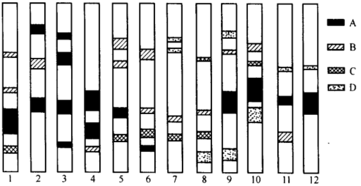


图 3-20　12 种熊胆的 SDS-PAGE 电泳图谱

1—马来熊胆；2—黑龙江产棕熊胆；3—延边产棕熊胆；4—四川产棕熊胆；
5—延边产黑熊胆；6—安徽产黑熊胆；7—四川灌县养鹿场产黑熊胆；
8—四川养鹿所产黑熊胆；9—云南屏边熊胆粉；10—辽宁桓仁熊胆粉；
11—贵阳天然熊胆；12—辽宁天然熊胆

〖附〗

① 天然熊胆（样品 11、样品 12）与人工引流熊胆（样品 1～8）及商品熊胆粉（样品 9、样品 10）之间区别明显。天然熊胆的电泳谱带数目少（样品 11 为 3 条，样品 12 为 2 条），而人工引流熊胆及商品熊胆粉的电泳谱带数目多；天然熊胆的电泳谱带 R_f 值均位于 0.35～0.65（即在中速区内），而人工引流熊胆及商品熊胆粉的电泳谱带 R_f 值位于中速区内的少或没有。因此，天然熊胆与人工引流熊胆及商品熊胆粉间较易区别；但人工引流熊胆与商品熊胆粉之间区别不甚明显。

② 比较人工引流熊胆（样品 1～8）电泳谱带发现，不同品种的特征谱带有一定的区别。棕熊胆（样品 2～4）特征谱带 R_f 值位于 0.60～0.65 之间的 A 级谱带；黑熊胆（样品 5～8）特征谱带 R_f 值位于 0.66～0.72 之间的 A 级和 B 级谱带；马来熊胆（样品 1）特征谱带 R_f 值位于 0.74 的 A 级谱带。同一品种熊胆的产地不同，其电泳谱带也不尽相同，其差异可能与其生境、食物结构及引流胆汁的浓度（引流相隔时间）等有关。

③ 比较商品熊胆粉（样品 9，10）、天然熊胆（样品 11，12）之间的不同产地样品也有不同程度的差异，其主要原因是存在熊品种的差异。

18. 蛇床子

〖来源〗　本品为伞形科植物蛇床［*Cnidium monnieri*（L.）Cuss.］的干燥

成熟果实。

【蛋白电泳鉴别】

(1) 材料　见表 3-5。

表 3-5　样品来源

样　　品	植 物 学 名	产　　地
蛇床子	*Cnidium monnierri*	河北 正定
蛇床子	*C. monnierri*	内蒙海拉尔伊敏桥
蛇床子	*C. monnierri*	辽宁 新民
蛇床子	*C. monnierri*	山东 济南
蛇床子	*C. monnierri*	江苏 高淳
兴安蛇床	*C. dahuricum*	内蒙海拉尔伊敏桥
碱蛇床	*C. salimum*	内蒙新巴尔虎左旗塔苏木乡

(2) 仪器　SCR 电泳仪（南京大学仪器厂），日本岛津蝇-930 型薄层扫描仪。

(3) 试剂　浓缩胶浓度 3.0%，分离胶浓度 12.5%。

(4) 方法

① 样品制备　称取样品 1.0g，加 pH6.8 的 Tris-盐酸缓冲溶液 8mL。研磨成匀浆，离心 15min（3500r/min），取上清液再离心 10min（4000r/min），取上清液加等量的样品胶缓冲溶液混匀，置水浴中煮沸 1～2min，供电泳分析用。

② 电泳　点样量 50μL，初始电流 15mA，待溴酚蓝指示剂到达分离胶位置时，加大电流到 20mA，保持该电流不变，当溴酚蓝指示剂迁移到距前沿 1cm 处，关闭电流，取出凝胶板，染色、脱色、固定，绘制电泳图谱。

③ 扫描　扫描条件为单波长透射法线性扫描，λ=600nm。

(5) 结果　见图 3-21、图 3-22。

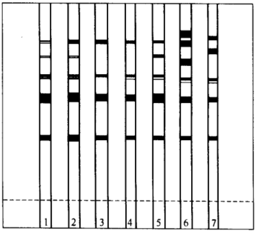


图 3-21　蛇床子蛋白电泳图谱

1—河北品；2—内蒙古品；3—辽宁品；4—山东品；5—江苏品；6—兴安蛇床子；7—碱蛇床子

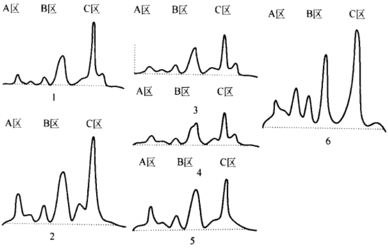


图 3-22 蛇床子蛋白电泳薄层扫描图谱

1—河北品；2—内蒙古品；3—辽宁品；

4—山东品；5—江苏品；6—兴安蛇床子

【附】 蛇床子可溶性蛋白电泳图谱可分 3 个区域：A 区 $R_f=0.14 \sim 0.28$，蛇床子具 1 条二级谱带，2～3 条三级谱带；兴安蛇床子具 2 条一级谱带，1 条二级谱带；碱蛇床子具 1 条一级谱带，1 条二级谱带。B 区 $R_f=0.36 \sim 0.48$，为 3～4条谱带，其中在 $R_f=0.46$、$R_f=0.48$ 处，蛇床子具 2 条一级谱带；兴安蛇床子、碱蛇床子则在 $R_f=0.47$ 处具 1 条一级谱带；在 $R_f=0.36$ 处，蛇床子具 1 条二级谱带，兴安蛇床子、碱蛇床子则具 1 条一级谱带。C 区 $R_f=0.67$，各样品均有 1 条一级谱带。

19. 鳖甲

【来源】 本品为鳖科动物鳖（*Trionyx sinensis* Wiegmann）的背甲。

【蛋白电泳鉴别】

（1）材料 非中华鳖的背甲，中华鳖（*Trionyx sinensis* Wiegmann）的背甲，缘板鳖（*Lissemys punctata* Bonnaterre）的背甲，鼋［*Pelochelys bibroni*（Owen)］的背甲，软鳖［*Trionyx catilaginens*（Boddaert)］的背甲，宏鳖（*Trionyx hurum* Gray）的背甲。

（2）仪器 DY2A 电泳仪，V162 夹心式垂直电泳槽，8021 离心机。

（3）试剂 丙烯酰胺（ACR），亚甲基双丙烯酰胺（Bis），三羟甲基氨基甲烷（Tris），过硫酸铵（AP），四甲基乙二胺（TEMED）等。

（4）方法

① 样品溶液 缓冲液提取液，酸性蛋白提取液，碱性蛋白提取液。

② 电泳操作 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）法。

（5）结果　样品经3种不同方法处理后所得的电泳图谱均有差异，可根据电泳谱带的数目、分布区域、着色程度及泳动率等方面来加以区别不同的鳖甲。

〖附〗 对5种不同品种的鳖甲样品以聚丙烯酰胺凝胶电泳法试验表明，各种不同种源的鳖甲含有相同的蛋白质，但其含量不尽相同。另外，不同种源的鳖甲也具有不同的蛋白质成分。

20. 沙苑子

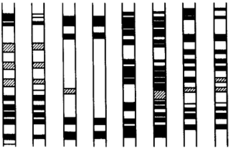
〖来源〗 本品为豆科植物扁茎黄芪（*Astragalus complanatus* R. Br.）的干燥成熟种子。

〖蛋白电泳鉴别〗

（1）材料　扁茎黄芪、紫云英（*A. sinicus* L.）、华黄芪（*A. chinensis* L.）和直立黄芪（*A. adsurgens* Pall）（沙大旺）等的种子。

（2）仪器　DYY-2型稳压稳流电泳仪（北京市六一仪器厂），圆盘电泳槽（北京市六一仪器厂），LD5-10型离心机（北京医用离心机厂）。

（3）试剂　丙烯酰胺为化学纯，双丙烯酰胺为进口原装，四甲基乙二胺为生化试剂，考马斯亮蓝 R_{250} 和考马斯亮蓝 G_{250} 为进口分装。凝胶浓度为6.3%。



1　1′　2　2′　3　3′　4　4′

图3-23　沙苑子等蛋白电泳图谱

1、1′—沙苑子；2、2′—紫云英；3、3′—华黄芪；4、4′—沙大旺；1～4—考马斯亮蓝 G_{250} 染色；1′～4′—考马斯亮蓝 R_{250} 染色；▬ Ⅰ级带；▨ Ⅱ级带

（4）方法

① 样品液的制备　取材料0.5g，加电极缓冲溶液5mL研磨成匀浆，静置30min，离心15min（3000r/min），取上清液0.5mL，加入0.05%溴酚蓝示踪指示剂1～2滴，混匀备用。

② 电泳　调节电流按1mA/管进行电泳，2min后按3.5mA/管进行电泳，待示踪指示剂行至距末端0.5cm时，关闭电源，全程约40min。

③ 染色　考马斯亮蓝 R_{250} 染色法：将胶条置固定液中固定10min，再置90℃染色液中染色10min，最后用洗脱液反复洗脱，至背景清晰为止。考马斯亮蓝 G_{250} 染色法：将胶条置染色液中，室温条件下染色30min即得。

（5）结果　见图3-23。

〖附〗 实验材料在相同条件下，分别用两种蛋白质染色剂考马斯亮蓝 R_{250} 和考马斯亮蓝 G_{250} 染色，所得电泳图谱基本相同，只是一些细带、弱带略有差异，如沙苑子和华黄芪用考马斯亮蓝 G_{250} 染色所得图谱与用考马斯亮蓝 R_{250} 染色所得图谱相比，少了一些弱带。但同时，沙苑子、紫云英、沙大旺的考马斯亮

蓝 G_{250} 电泳图谱比考马斯亮蓝 R_{250} 电泳图谱也多了一些谱带，说明考马斯亮蓝 G_{250} 的染色效果较好。

21. 紫苏子

〖来源〗 本品为唇形科植物紫苏［*Perilla frutescens*（L.）Britt.］的干燥成熟果实。

〖蛋白电泳鉴别〗

（1）材料 紫苏子，小鱼仙草子［*Mosla dlanthena*（Buch-Ham.）Maxim 的果实］，菟丝子（*Cuscuta chinensis* Lam. 的种子），白芥子（*Sinapis alba* L. 的种子），黄芥子［*Brassica juncea*（L.）Czem. Et Coss 的种子］，莱菔子（*Raphanus sativus* L.）。

（2）仪器 DYY-Ⅲ8 型稳压稳流定时电泳仪，DYY-H121 型电泳槽。

（3）方法

① 样品制备 各取样品粉末 1g，加入稀释 4 倍的浓缩胶缓冲溶液，置乳钵中研磨成匀浆，离心 20min（4000r/min），取上清液置冰箱中备用。

② 电泳 样品上清液加入等体积的 40%蔗糖混匀，用微量注射器点样 100μL。上槽的电极缓冲溶液中加入 1～2 滴溴酚蓝指示剂示踪。电泳开始时电流控制在 15mA，样品进入分离胶后电流加大到 30mA。待示踪指示剂距前沿约 1cm 时停止电泳。

③ 染色与脱色 用 1%的考马斯亮蓝 R_{250} 染色液在 37℃染色 1h，再用含 20%甲醇和 7%醋酸的脱色液脱色，每天更换脱色液，直至背景无色为止。

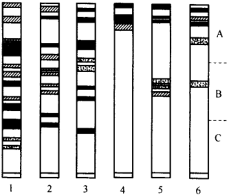


图 3-24 紫苏子及其类似品的电泳图谱
1—紫苏子；2—小鱼仙草子；3—菟丝子；4—白芥子；5—黄芥子；6—莱菔子

（4）结果 见图 3-24。按泳动距离将电泳图谱分为慢速（A）、中速（B）、快速（C）3 个区（表 3-6）。

表 3-6 紫苏子及其类似品电泳谱带统计

样品	A区			B区			C区			总带数	样品	A区			B区			C区			总带数
	一级谱带	二级谱带	三级谱带	一级谱带	二级谱带	三级谱带	一级谱带	二级谱带	三级谱带			一级谱带	二级谱带	三级谱带	一级谱带	二级谱带	三级谱带	一级谱带	二级谱带	三级谱带	
紫苏子	2	3		2	3		1		2	13	白芥子	2	1								3
小鱼仙草子		4			3	2		1		10	黄芥子	3				1	2				6
菟丝子	2	2	1		2	1	1			9	莱菔子	2	1	1			1				5

22. 人参

【来源】 本品为五加科植物人参（*Panax ginseng* C. A. Mey.）的干燥根。

【蛋白电泳鉴别】

（1）材料　人参、西洋参（*Panax quinquefolium* L.）和桔梗［*Platycodon grandiflorum*（Jacq.）A. DC.］的干燥根。

（2）方法

① 样品制备　各称取样品粉末0.5g（50目），分别加入稀释4倍的浓缩胶缓冲溶液4mL，在研钵中研磨匀浆，转移到离心管中，离心15min（3500r/min），取上清液置冰箱中备用。

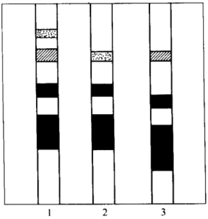


图3-25　人参等的电泳图谱

1—桔梗；2—西洋参；3—人参

② 电泳　取样品上清液，点样20μL，在上槽的电极缓冲溶液中加入2滴溴酚蓝指示剂示踪。电泳开始时电流控制在10mA，待样品进入分离胶后电流加大到20mA，整个电泳过程维持电流强度不变。待示踪指示剂距前沿约1cm时停止电泳，取出胶板，用0.1%的考马斯亮蓝R_{250}染色，在37℃染色1h，再用含20%甲醇和7%醋酸的脱色液脱色，反复更换脱色液，直至背景清晰为止。

（3）结果　见图3-25。

【附】 由图3-25可知，人参有2条一级谱带，1条二级谱带。西洋参有2条一级谱带，1条三级谱带。桔梗有2条一级谱带，1条二级谱带，1条三级谱带。

23. 石菖蒲

【来源】 本品为天南星科植物石菖蒲（*Acorus tatarinowii* Schott.）的干燥根茎。

【蛋白电泳鉴别】

（1）材料　石菖蒲、水菖蒲（*A. calamus* L.）、钱蒲（*A. granineus* var. *pusillus* Engl.）、阿尔泰银莲花（九节菖蒲）（*Anemone altaica* Fisch.）的根茎。

（2）仪器　DYY-Ⅲ8型稳压稳流定时电泳仪，DYY-Ⅲ21型电泳槽。

（3）方法

① 样品制备　各取样品1g，加5mL稀释4倍的浓缩胶缓冲溶液，研磨成匀浆状，离心15min（4000r/min），取上清液置冰箱中备用。

② 电泳　采用垂直板凝胶电泳，点样100μL。上槽电极缓冲溶液中加入1滴溴酚蓝指示剂示踪。电泳开始时，电流控制在15mA，当样品进入分离胶后电

流加大到 30mA。整个电泳过程维持电流强度不变，待示踪液移至距胶板末端 1cm 处，停止电泳。

③ 染色　用 0.2%考马斯亮蓝 R_{250} 在 38℃下染色 1h，然后用含 20%甲醇和 7%醋酸的脱色液进行脱色。

（4）结果　见图 3-26、表 3-7。

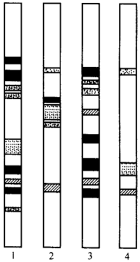


图 3-26　石菖蒲等蛋白电泳图谱
1—石菖蒲；2—水菖蒲；
3—钱蒲；4—九节菖蒲

表 3-7　石菖蒲等电泳谱带统计表

谱	带	石菖蒲	水菖蒲	钱蒲	九节菖蒲
A区	一级	1		1	
	二级	1			
	三级		1	1	1
B区	一级			1	
	二级		1	2	
	三级	3	2	1	1
C区	一级	2		1	
	二级		1	1	
	三级	2			1
总谱带数		9	5	8	3

24. 哈蟆油

【来源】 本品为蛙科动物中国林蛙（*Rana temporaria chensinensis* David.）的输卵管。

【蛋白电泳鉴别】

（1）材料　哈蟆油，黑龙江林蛙（*Rana amurensis* Boulenger）的输卵管，中华大蟾蜍（*Bufo bufo gargarizans* Cantor）的输卵管，蟾酥（中华大蟾蜍的皮肤腺浆液），鸡（*Gallus gallus domesticus* Brisson）的沙囊内壁（鸡内金），绿头鸭（*Anas platyrhynchos* Linnaeus）的沙囊内壁（鸭内金）。

（2）仪器　SCR-3 型稳流稳压电泳仪，ZVS-100 型垂直板块凝胶电泳池。

（3）方法

① 样品制备　称取样品适量，分别加入稀释 4 倍的浓缩胶缓冲溶液和少量石英砂研磨，离心 20min（3000r/min）。取上清液置冰箱中备用。

② 电泳　样品上清液加入等体积的 10%蔗糖液混匀，点样，用溴酚蓝指示剂示踪。电泳开始时，电流控制在 15mA，样品进入分离胶后加大到 25mA，整

个电泳过程维持电流强度不变。待示踪指示剂距前沿约 1cm 时，停止电泳。

用 0.2%的考马斯亮蓝 R_{250} 在 37℃染色 1h，再用含 20%甲醇和 7%醋酸的脱色液脱色。

（4）结果　见图 3-27、表 3-8。

表 3-8　哈蟆油等样品的主要鉴别谱带泳动率

样　品	谱　带	泳动率	样　品	谱　带	泳动率
哈蟆油	A2	0.07	中华大蟾蜍输卵管	B8	0.53
	A5	0.13	蟾酥	A8	0.24
	A8	0.23		B5	0.44
	B4	0.11	鸡内金	A5	0.13
	B5	0.16		A7	0.21
	B11	0.68		A8	0.25
	C2	0.79		B1	0.35
黑龙江林蛙输卵管	A2	0.06	鸭内金	A5	0.12
	A5	0.13		A7	0.21
	B10	0.62		A9	0.28
	C1	0.74		B9	0.56
中华大蟾蜍输卵管	A9	0.30			

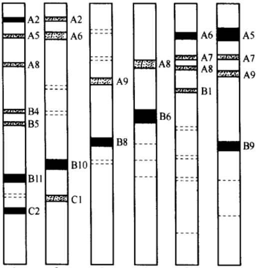


图 3-27　哈蟆油等的电泳图谱

1—哈蟆油；2—黑龙江林蛙输卵管；3—中华大蟾蜍输卵管；
4—蟾酥；5—鸡内金；6—鸭内金

25. 乌梢蛇

【来源】 本品为游蛇科动物乌梢蛇［*Zaocys dhumnades*（Cantor）］的干燥体。

【蛋白电泳鉴别】

（1）材料 乌梢蛇，王锦蛇。

（2）仪器 ECD3000 稳流稳压电泳仪，DYY-Ⅲ28A 型电泳槽。

（3）方法

① 样品制备 称取干燥的粉末样品适量，加入稀释 4 倍的浓缩胶缓冲溶液（pH6.7）研磨匀浆。离心 15min（4000r/min），置冰箱中备用。

② 电泳 取样品上清液，加入等体积的 40％蔗糖溶液混匀，点样。用溴酚蓝指示剂示踪。电泳开始时，电流加大到 15mA，待样品进入分离胶后，电流加大到 25mA，整个电泳过程维持电流强度不变，待指示剂行至距末端 1cm 时，停止电泳。

③ 染色 在 0.2％考马斯亮蓝 R_{250} 染色液中，36℃恒温下染色 1h，再用含 20％甲醇和 7％醋酸的脱色液在 36℃恒温脱色。

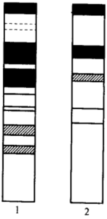


图 3-28 乌梢蛇等蛋白电泳图谱

1—乌梢蛇；2—王锦蛇

（4）结果 见图 3-28。

【附】 由电泳图谱可见乌梢蛇与伪品王锦蛇的蛋白电泳图谱差异显著。乌梢蛇一级谱带 3 条，二级谱带和三级谱带各 2 条，扩散带 1 条；王锦蛇一级谱带 2 条，二级和三级谱带各 1 条，二者在电泳图上可明显区分。

26. 羚羊角

【来源】 本品为牛科动物赛加羚羊（*Saiga tatarica* Linnaeus）的角。

【蛋白电泳鉴别】

（1）材料 羚羊角，犀角和广角（上海市药材公司），鹿茸（上海雷允上制药厂），水牛角（上海中药一厂），黄牛角（上海屠宰场）。

（2）仪器 DY-A 电泳仪，V-16 夹心式电泳槽。

（3）方法

① 凝胶及缓冲溶液的制备 pH8.3 系统制备凝胶及缓冲溶液，其中分离胶浓度为 15％，浓缩胶浓度为 2.5％。

② 供试品溶液的制备 取上述样品经粉碎后过 100 目筛，按每克加入 5mL 稀释 2 倍的电极缓冲溶液，置乳钵中研磨成匀浆，超声波提取 30min，离心 20min（3000r/min），取上清液置冰箱备用。

③ 电泳　取供试品上清液加入等体积40％蔗糖液混匀，微量进样器上样各6μL，其中水牛角80μL、犀角100μL，用溴酚蓝指示剂示踪。电泳开始电流控制在15mA，样品进入分离胶后加大到30mA，整个电泳过程维持电流强度不变，待指示剂距前沿约1cm处，停止电泳。

④ 染色脱色　取出胶板，蒸馏水冲洗后放入0.2％考马斯亮蓝R_{250}染色液中，染色40min，然后用脱色液（醋酸∶水∶乙醇体积比为：1∶8∶1）进行脱色，直到背景无色为止。

(4) 结果　见表3-9、图3-29。

【附】 羚羊角、黄牛角为二级谱带。鹿茸、广角为一级谱带。犀角、水牛角为三级谱带。广角的电泳谱带20条，其中一级谱带1条、二级谱带6条、三级谱带13条，分布在A、B、C三个区。鹿茸一级谱带有1条，在A区；三级谱带有7条，分布在A、B两区。黄牛角的二级谱带有6条，A区4条，B区2条。犀角三级谱带多至7条，分布在A、B、C三区。水牛角的谱带最少，共6条，集中在A区。由此可见，利用蛋白电泳技术鉴别易混淆的角类药材是切实可行的。

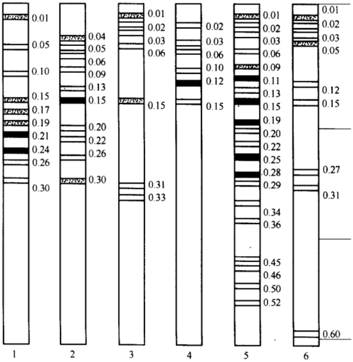


图3-29　羚羊角等电泳图谱

1—黄牛角；2—鹿茸；3—羚羊角；4—广角；5—水牛角；6—犀角

表 3-9　羚羊角等蛋白电泳结果

样品	谱带数	各级电泳谱带的数量及其分布									泳动率
		A区			B区			C区			
		一	二	三	一	二	三	一	二	三	
黄牛角	10		4	2		2	2				$A_1$0.01, $A_5$0.15, $A_9$0.17, A_{10}0.19, B_{11}0.21, B_{13}0.24
鹿茸	10	1	1	4		1	3				$A_2$0.04, $A_8$0.15, B_{15}0.30
羚羊角	7		2	3			2				$A_1$0.01, $A_8$0.15, B_{16}0.31
广角	20	1	4	4		2	5			4	$A_1$0.01, $A_4$0.06, $A_5$0.09, $A_6$0.11, $A_8$0.15, A_{10}0.19, B_{12}0.23, B_{14}0.28, C_{17}0.50
水牛角	6		1	5							$A_7$0.05, $A_8$0.15
犀角	9		2	4			2			1	$A_1$0.01, $A_3$0.05, B_{15}0.31, C_{18}0.60

注：一、二、三分别代表一级谱带，二级谱带，三级谱带。

27. 栀子

【来源】 本品为茜草科植物栀子（*Gardenia jasminoides* Ellis）的果实。

【蛋白电泳鉴别】

（1）材料　栀子、水栀子（*Gardenia jasminoides* Ellis var. *grandiflora* Nakaihe）的果实。

（2）仪器　DYY-Ⅲ型稳流稳压电泳仪，垂直板式及圆盘式电泳槽（北京六一仪器厂）。

（3）试剂　亚甲基双丙烯酰胺（含量不低于 98.5%），丙烯酰胺（含量不低于 98.5%），三羟甲基氨基甲烷（Tris，含量不低于 99.8%）等。

分离胶缓冲溶液（pH8.9）：36.6g Tris，48.0mL 1mol/L HCl 调 pH8.9，加水至 100mL。

分离胶储备液：28g 丙烯酰胺（ACR），0.74g 亚甲基双丙烯酰胺，加水至 100mL，滤过后使用。

过硫酸铵溶液：0.56g 过硫酸铵溶于 100mL 水中。

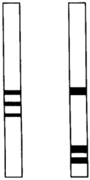
浓缩胶缓冲溶液（pH6.7）：5.98g 三羟甲基氨基甲烷（Tris），48.0mL 1mol/L HCl 调 pH6.7，加水至 100mL。

浓缩胶储备液：10g 丙烯酰胺（ACR）、2.5g 亚甲基双丙烯酰胺，加水至 100mL，滤过后使用。

核黄素溶液：4mg 核黄素加水至 100mL。

40%蔗糖溶液：40g 蔗糖，加水至 100mL。

电极缓冲溶液：先配成储备液。6g 三羟甲基氨基甲烷（Tris）、28.8g 甘氨酸，用水溶成 100mL（pH8.3）。用前再稀释 10 倍。



1　　2

图 3-30　栀子蛋白电泳图谱
1—栀子；
2—水栀子

（4）方法

① 分离胶与浓缩胶的制备　将已配好的分离胶缓冲溶液、分离胶储备液、过硫酸铵、水按 1∶2∶1∶4 的比例配制分离胶；将已配制好的浓缩胶缓冲溶液、浓缩胶储备液、核黄素、40%蔗糖溶液按 1∶2∶1∶4 比例配制浓缩胶，置真空干燥器内。

② 样品的制备　称取样品 1g，加入 Tris-HCl 缓冲溶液 5mL，研磨匀浆，离心 20min，上清液置冰箱中备用。

③ 电泳　点样 20μL 左右，用 1～2 滴溴酚蓝指示剂示踪，电泳开始后，电流控制在 10mA，样品进入分离胶后加大到 30mA，待指示剂行至距末端 1cm 时，即可停止电泳，需 2～3h。

④ 染色与脱色　用 0.2%考马斯亮蓝 R_{250} 染色液在 36℃染色 1h，再用 20%甲醇和 7%醋酸的脱色液在 36℃进行脱色。

（5）结果　见图 3-30。

【附】 栀子在中部区域有 3 个近等距的细条状谱带，其泳动率分别为 0.33、0.38、0.48；水栀子在上部区域具有 2 个宽大谱带，近中下部区域有 1 条谱带，其泳动率分别为 0.07、0.12、0.35。

28. 川楝子

【来源】 本品为楝科植物川楝（*Melia toosendan* Sieb. et Zucc.）的干燥成熟果实。

【蛋白电泳鉴别】

（1）材料　川楝子，苦楝子（*Melia azedarach* L.），刀豆［*Canavalia gladiata*（Jacq.）DC.］，长春油麻藤（*Mucuna sempervirens* Hemsl.），石莲子（*Nelumbo mucifera* Gaertn），苦石莲（*Caesalpinia minax* Hance），诃子（*Terminalia chebula* Retz.），青果［*Canarium album*（Lour.）Raeusch.］。

（2）仪器与试剂　DYY-Ⅲ2 型稳压稳流电泳仪，圆盘电泳槽。凝胶浓度为 6.3%。

（3）方法

① 样品液的制备　取样品 0.5g，加电极缓冲溶液 5mL 研磨成匀浆，静置 30min，转移至离心管中，离心 15min（3000r/min），取上清液 0.5mL 加入 0.05%溴酚蓝示踪指示剂 1～2 滴，混匀备用。

② 电泳　调节电流按 1mA/管进行电泳，2min 后，按 3.5mA/管进行电泳，待示踪指示剂行至距末端 0.5cm 时，关闭电源，全程为 40min。

③ 染色　将胶条置固定液中固定 10min，用考马斯亮蓝 R_{250} 染色液在 90℃

染色 10min，最后用洗脱液反复洗脱，至背景清晰为止。

（4）结果　见图 3-31。

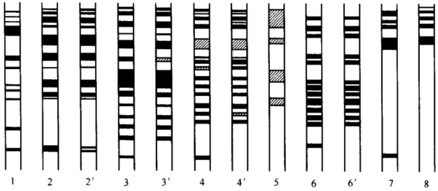


图 3-31　川楝子等的蛋白质电泳图谱

1—川楝子；2，2′—苦楝子；3，3′—刀豆；4，4′—长春油麻藤子；

5—石莲子；6，6′—苦石莲；7—诃子；8—青果；

1～8—考马斯亮蓝 G_{250} 染色；2′，3′，4′，6′—考马斯亮蓝 R_{250} 染色

29. 天麻

【来源】 本品为兰科植物天麻（*Gastrodia elata* Blume）的干燥块茎。

【蛋白电泳鉴别】

（1）材料　天麻素标准品，天麻，商陆，黄精，天花粉和大九股牛。

（2）仪器　Waters Quanta 4000E Capillary Elec-trophoresissystem（美国），内设恒温系统和固定波长紫外检测器；未涂层熔硅弹性石英毛细管，内径 75μm，柱长 60cm，有效柱长 52cm；紫外检测波长设在 214nm，检测灵敏度为 0.005；数据采集和处理使用 Waters Millennium2010 色谱软件。

（3）方法

① 样品液制备　精密称取样品粉末，分别以蒸馏水和 70%乙醇经冷浸提取 48h，滤过，备用。称取一定量天麻素标准品，用 10mL 双蒸水溶解，备用。

② HPCE 测定　实验前，首先将毛细管在室温下用铬酸洗液清洗。每次进样前分别用 0.1mol/L 的 NaOH 溶液和双蒸水各冲洗 4min，再用背景缓冲溶液冲洗 4min。

③ 电泳条件的选择　天麻中含有天麻素、对羟基苯甲醇、香草醇、香草醛等有效成分，其中天麻素的含量较高，因此选择天麻素作为真伪鉴别的参考标准。为使天麻素与天麻中的其他成分分离开来，分别考察了硼酸盐的浓度、缓冲溶液的 pH 值、操作电压对其分离的影响，最后确定 24mmol/L 硼酸盐，pH 值为 9.4，运行电压 16kV。

样品采用重力进样，进样时间为 5s。

④ 天麻中天麻素的测定　精密吸取一定体积的天麻素标准溶液，加水稀释配成不同浓度，以校正峰面积对浓度作图，绘制标准曲线。

（4）结果

① 天麻及其 4 种易混品的鉴别见图 3-32。

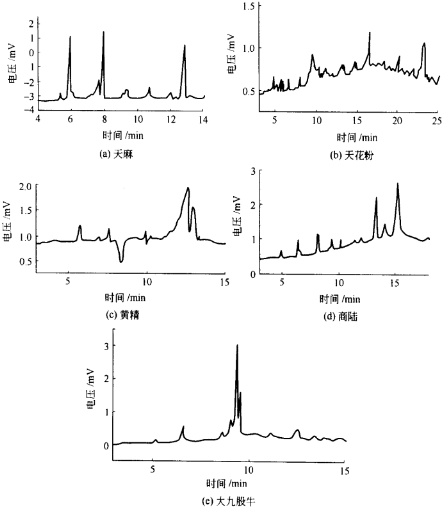


图 3-32　天麻等水提取液电泳图谱

② 天麻素在 0.0224～0.448mg/mL 范围内呈良好线性关系，线性相关方程为 $y=-0.048+7.79x$（$r=0.999$）。

天麻水提取液中天麻素的含量（g/g）为 0.212%，$RSD=1.78\%$（$n=5$），回收率为 100.2%；天麻 70%乙醇提取液中天麻素的含量（g/g）为 0.219%，$RSD=2.97\%$（$n=5$），回收率为 99.0%。

二、含同工酶类中药的鉴定

1. 当归

【来源】 本品为伞形科植物当归［*Angelica sinensis*（Oliv.）Diels］的干燥根。

【过氧化物酶同工酶电泳鉴别】

（1）材料　当归、欧当归、独活的鲜叶（去叶脉）。

（2）方法

① 样品液制备　取干燥样品1g（鲜品2g）于研钵中，加入0.02mol/LTris-甘氨酸（pH8.7）的提取液适量在冰浴中研磨匀浆，离心20min（4000r/min），取上清液存于冰箱中，备用。

② 垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳　分离胶浓度为7.5%，浓缩胶浓度为2.5%。每孔加样50μL。电极缓冲溶液为Tris-甘氨酸缓冲溶液（pH8.3）。以溴酚蓝作电泳指示剂。采用稳定电泳，电压15V/cm，电泳5h，重复两次。用醋酸联苯胺染色5～10min。

（3）结果　见图3-33。

【附】 当归、欧当归鲜叶的谱带在慢速区及中速区都相同，即 R_f=0.172～0.946，但快速区的谱带有所不同。独活鲜叶的谱带在慢速区有1条与前两种的谱带相同，即 R_f=0.172，在中速区有2条与前两种的相同，即 R_f=0.286～0.324。说明这3种植物叶的过氧化物同工酶有共同的谱带。而当归与欧当归的谱带重叠数较多。这3个种的干品的谱带数相对较少。R_f=0.186～0.279，且谱带数重叠的也较少。可能与干品中的过氧化物酶活性降低有关。

植物鲜品的过氧化物酶谱带较清晰，而干品的过氧化物酶谱带不很清晰，表明鲜品中过氧化物酶活性较高，干品中的过氧化物酶活性较低。

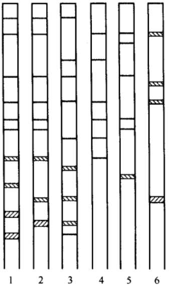


图3-33　当归等电泳图谱

1—当归鲜叶；2—欧当归鲜叶；3—独活鲜叶；4—当归；5—欧当归；6—独活；

▨ 强带；— 中强带；▭ 弱带

2. 白首乌

【来源】 本品为萝藦科植物飞来鹤（耳叶牛皮消）（*Cynanchum auriculatum* Royle et Wight.）、隔山牛皮消［*Cynanchum wifordii*（Maxim.）Hemsl.］或戟叶牛皮消（*Cynanchum bungei* Decne.）的干燥块根。

【蛋白及同工酶电泳鉴别】

（1）材料　见表 3-10。10～11 月间分别采收样品，冷冻保鲜。

表 3-10　样品来源

样　　品	植物学名	产　　地
泰山白首乌(野生)	*Cynanchum bungei* Decne	济南历城
耳叶牛皮消(野生)	*C. auriculatum* Royle ex Wigbt.	蒙山
白首乌(栽培)	*C. auriculatum* Royle ex Wigbt.	江苏滨海
隔山消(野生)	*C. wifordii*(Maxim.)Hemsl.	崂山
何首乌(栽培)	*Polygonum multiflorum* Thunb.	山东中医药大学校园

（2）仪器　DYY-Ⅲ型多用电泳仪，DYY-Ⅲ28D 型垂直电泳槽等。

（3）试剂　提取液：由 2.99g 三羟甲基氨基甲烷＋24mL HCl（1mol/L），加水至 100mL；用时取 25mL 加水至 100mL，摇匀即得。

（4）方法

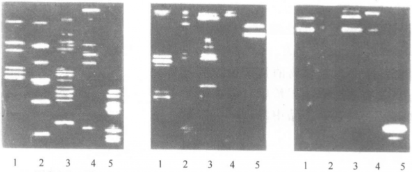
① 蛋白质电泳

a. 样品制备　称取干燥样品 1.0g，加入 1mL 提取液（pH8.9），常温下超声提取 30min，离心 20min（3500r/min），上清液加等体积 40％蔗糖溶液混匀，置冰箱内冷藏，供点样用。

b. 电泳与染色　3％浓缩胶与 7.5％分离胶制备凝胶板。点样 40μL，用溴酚蓝指示剂示踪，电泳开始时稳流 15mA，样品进入分离胶后，稳流 25mA。待示踪指示剂行至距琼脂层约 1cm 时，停止电泳。用考马斯亮蓝染色液在 37℃染色 1～2h。

② 过氧化物酶（POD）同工酶电泳

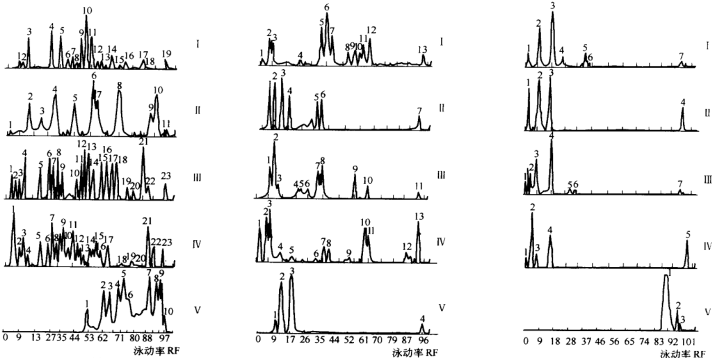
a. 样品制备　称取样品（鲜品冷冻）1.0g，冰浴研磨，加入 1mL 电极缓冲溶液（三羟甲基氨基甲烷，pH8.3），冰浴超声提取 30min，0℃离心 20min



(a) 蛋白电泳图谱　(b) POD 同工酶电泳图谱　(c) ES 同工酶电泳图谱

图 3-34　白首乌电泳图谱

1—泰山白首乌；2—耳叶牛皮消；3—栽培白首乌；4—隔山消；5—何首乌



(a) 蛋白　(b) POD同工酶　(c) ES同工酶

Ⅰ—泰山白首乌；Ⅱ—耳叶牛皮消；Ⅲ—栽培白首乌；Ⅳ—隔山消；Ⅴ—何首乌

图 3-35　白首乌电泳指纹图谱

(8000r/min)，上清液加等体积40%蔗糖溶液混匀，置冰箱内冷藏，备用。

b. 电泳与染色　3%浓缩胶与7.5%分离胶制备凝胶板，电泳方法同上。将胶板浸于醋酸联苯胺液内，加2～3滴30%双氧水，10～15min后出现清晰的蓝色谱带。

③ 酯酶(ES)同工酶电泳

a. 样品制备　称取样品(鲜品冷冻)1.0g，冰浴研磨，加入1mL电极缓冲溶液(pH8.3)，冰浴超声提取30min，0℃离心20min(8000r/min)，上清液加等体积10%甘油混匀，置冰箱内冷藏，备用。

b. 电泳与染色　4%浓缩胶与10%分离胶制备凝胶板，电泳方法同上。将胶板浸于新配制的坚牢蓝染色液内，10～15min后出现清晰的桃红色谱带。

④ 指纹图谱　将蛋白质、POD同工酶及ES同工酶电泳凝胶板经凝胶成像紫外分析仪处理后，得到以泳道中各谱带的光密度(OD)值为纵坐标、谱带泳动率R_f为横坐标的电泳指纹图谱。

(5) 结果　见图3-34、图3-35。

3. 红花

【来源】 本品为菊科植物红花(*Carthamus tinctorius* L.)的干燥花。

【同工酶电泳鉴别】

(1) 材料　新疆吉木萨尔居群、河南新乡居群、四川简阳居群、云南巍山等不同地区红花植物居群的种子，播种于植物园栽培，收集花粉和花蕾期苞叶。

(2) 仪器　Hitachi S-520型扫描电子显微镜。

(3) 试剂

① A液　1mol/L盐酸48mL，四甲基乙二胺0.24mL，加水定容至100mL。

② C液　丙烯酰胺30g，亚甲基双丙烯酰胺0.8g，加水溶解定容至100mL。

③ G液　过硫酸铵0.14g，加水溶解定容至100mL(新鲜配制)。

④ 电极缓冲溶液　三羟甲基氨基甲烷(Tris)0.6g，甘氨酸2.88g，加水溶解定容至100mL；使用时稀释10倍。

⑤ 染色液　1%二甲基对苯二胺1份，1%α-萘酚(溶于体积分数为40%的乙醇)1份，0.1mol/L磷酸缓冲溶液(pH7.4)25份，混合后使用。

⑥ 凝胶的制备　采用垂直平板电泳法，连续凝胶系统，配制凝胶液，A液∶C液∶水∶G液为1∶2∶1∶4(体积之比)，制备凝胶。

(4) 方法

① 样品液制备　取不同栽培居群红花花蕾期苞叶，鲜重1.0g，于低温冰箱中固定1h，加20%蔗糖电极缓冲溶液3mL，在冰浴中研磨成匀浆状，0℃离心20min(8000r/min)，取上清液，备用。

② 电泳　点样 8μL，在上槽电极液中加入溴酚蓝指示剂数滴，保持电压 300V，电流 25mA，当指示剂迁移至下端时，停止电泳。

③ 染色和固定　用染色液染色 10min，用蒸馏水漂洗 10min，放入 3%的冰醋酸中固定。

（5）结果　见图 3-36。

【附】 红花共有 8 条同工酶谱带，迁移率由小到大依次为 0.072（a）、0.160（b）、0.296（c）、0.464（d）、0.490（e）、0.627（f）、0.676（g）、0.922（h）。谱带 a，c，d，f，g 是 4 个栽培居群共有酶带。吉木萨尔居群谱带 f 明显，其他居群不明显；新乡居群缺少谱带 e，而其他居群均有；谱带 b 和谱带 h 是简阳居群特有谱带；巍山居群与其他居群相比无特殊性。

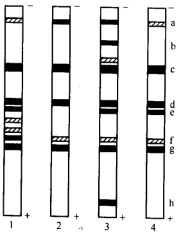


图 3-36　不同栽培居群红花细胞色素氧化酶同工酶谱图

1—吉木萨尔居群；2—新乡居群；3—简阳居群；4—巍山居群

红花苞叶细胞色素氧化酶谱带可以从分子水平鉴别不同的栽培居群；红花中化学成分含量的高低，主要与遗传因素有关，同时，也受环境条件的影响。这为红花的引种栽培以及优良栽培居群的选育提供依据。

4. 人参

【来源】 本品为五加科植物人参（*Panax ginseng* C. A. Mey.）的干燥根。

【同工酶电泳鉴别】

（1）材料　人参，西洋参（*Panax quin quefolium* L.）[过氧化物酶同工酶（PER）分析用 1 年生全株，酯酶同工酶（EST）分析用胚率为 60%的种子]。

（2）方法

① 过氧化物酶酶液样品制备　取展叶后全株，洗净泥土，在 Tris-HCl 缓冲溶液中［质量(g)：体积(mL)＝1：3］冰浴下研磨成匀浆，离心 10min（15000r/min），取上清液加入等体积 40%蔗糖液，置冰箱中备用。

② 酯酶酶液的制备　取去皮种仁在磷酸缓冲溶液（pH7.5）中研磨样品，4℃下孵化过夜，离心 10min（15000r/min），加入 40%蔗糖液制成样品，置冰箱中备用。

③ 电泳　过氧化物酶、酯酶同工酶的分离均采用不连续系统的聚丙烯酰胺垂直平板电泳法。凝胶浓缩在 Tris-HCl 缓冲系统中进行，分离胶浓度为 7.5%（pH8.9），浓缩胶浓度为 3.3%（pH6.7）。电泳在电极缓冲溶液为 Tris-甘氨酸（pH8.3）的缓冲系统中进行（温度为 4℃）。电泳起始电流 1mA/cm，进入分离胶时为 2mA/cm。

④ 染色及酶谱分析　过氧化物酶同工酶采用改良的醋酸联苯胺染色法染色；酯酶同工酶采用醋酸-α-萘酯和醋酸-β-萘酯混合的磷酸缓冲溶液（pH6.4，0.1mol/L），在坚牢蓝 RR 盐染色液中染色，直到酶带清晰为止，然后将胶置于7%醋酸液中脱色。分析酶谱并计算各酶带的 R_f 值。在 UV-240 双波色扫描仪上扫描，分析扫描图谱。

（3）结果　见图 3-37、表 3-11、图 3-38、表 3-12、图 3-39。

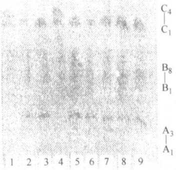


图 3-37　人参和西洋参过氧化物酶同工酶电泳图谱

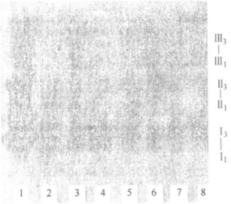


图 3-38　人参和西洋参酯酶同工酶电泳图

表 3-11　人参、西洋参过氧化物同工酶电泳特征

人参			西洋参		
酶带号	迁移率(R_f)	强度	酶带号	迁移率(R_f)	强度
A_1	0.72	+			
A_2	0.62	+			
A_3	0.63	+++			
B_1	0.51	++			
B_2	0.48	++	B_2	0.48	++
B_3	0.45	++	B_3	0.45	++
B_4	0.42	++	B_4	0.42	++
B_5	0.38	+++	B_5	0.38	+++
B_6	0.35	+++	B_6	0.35	+++
B_7	0.33	+++	B_7	0.33	+++
B_8	0.31	++	B_8	0.31	++
C_1	0.21	++++	C_1	0.21	++++
C_2	0.19	++++	C_2	0.19	++++
			C_3	0.17	++++
			C_4	0.15	++++

表 3-12　人参、西洋参酯酶同工酶电泳特征

人参			西洋参		
酶带号	迁移率(R_f)	强度	酶带号	迁移率(R_f)	强度
$Ⅰ_1$	0.55	++++	$Ⅰ_1$	0.58	++++
$Ⅰ_2$	0.53	++++	$Ⅰ_2$	0.56	+++++
$Ⅰ_3$	0.51	++++	$Ⅰ_3$	0.54	++++
$Ⅱ_1$	0.39	++	$Ⅰ_4$	0.48	++++
$Ⅱ_2$	0.37	++	$Ⅰ_5$	0.46	+++++
$Ⅱ_3$	0.35	++	$Ⅰ_6$	0.48	++++
$Ⅲ_1$	0.20	+	$Ⅱ_1$	0.36	+++
$Ⅲ_2$	0.18	+	$Ⅱ_2$	0.32	++++
$Ⅲ_3$	0.16	+	$Ⅱ_3$	0.28	+++

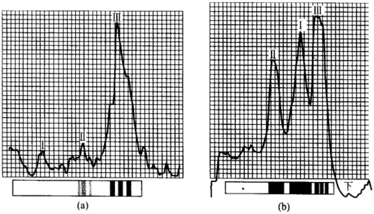


图 3-39　人参（a）和西洋参（b）酯酶同工酶电泳扫描曲线及酶谱示意图

〖附〗

①人参、西洋参过氧化物酶同工酶电泳图谱按迁移率不同分为 3 个区：快速区（A）、中速区（B）和慢速区（C）。西洋参过氧化物酶只有 B 区和 C 区，且在 C 区的西洋参酶带数多于人参，而在 B 区的西洋参酶带数则少于人参。人参、西洋参在过氧化物酶同工酶酶谱上存在明显差异。

② A 区的 A_3 酶谱可作为人参种的过氧化物酶同工酶的特征带。而 C 区西洋参有 C_3、C_4 等色深的过氧化物酶同工酶特征带。另外，C_1、C_2 两条酶带为人参、西洋参共有。

③ 人参酯酶同工酶图谱也可根据迁移率（表 3-12）不同分为 3 个谱带区，即Ⅰ区、Ⅱ区和Ⅲ区。西洋参种子的酯酶同工酶图谱依迁移率可分两个谱带区，即Ⅰ区和Ⅱ区。西洋参种子的酯酶同工酶活性明显强于人参种子，且两者在酯酶同工酶酶谱上存在明显差异。经进一步扫描分析发现（图 3-39），西洋参在Ⅰ区的酶带数多于人参，共有 6 条，且酶活性（峰值）很强；而人参在Ⅰ区仅有 3 条酶带，并且酶活性相对较弱。西洋参和人参虽然在Ⅱ区都有 3 条酶带，但迁移率

不同，西洋参酶带宽而染色深。人参与西洋参的酯酶同工酶酶谱完全不同，没有任何迁移率相同的谱带。人参和西洋参在酯酶酶谱中明显反应出了各自种的特异性。

5. 红曲

〖来源〗 本品为曲霉科真菌紫红曲霉（*Monacus purpureus* Went）寄生在粳米上发酵而成。

〖蛋白酶和淀粉酶活力的测定〗

（1）材料 见表 3-13。

表 3-13 红曲的样品来源

编 号	来 源	产 地
H01	淄博市药材公司	山东 周村
H02	武汉市药材公司	
H03	长沙市药材公司	
H04	江阴市药材公司	江苏 江阴
H05	永康市药材公司	浙江 永康
H06	福州市药材公司	福建 古田
H07	广州市药材公司	广东 蕉岭
H08	上海市药材公司	广东 五华
H09	石家庄市药材公司	
H10	南京市药材公司	
H11	镇江市药材公司	
H12	古田市药材公司	福建 古田
H18	诱变育种所得菌株经在粳米上发酵而成	

（2）仪器 UV-265 型紫外分光光度计（日本）。

（3）试剂 酪氨酸（中国药品生物制品检定所）等。

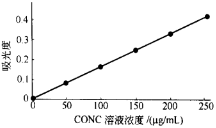


图 3-40 酪氨酸对照品溶液的标准曲线

（4）方法

① 供试酶液的制备 将各地产红曲分别粉碎，过 20 目筛，取样品粉末约 5g，精密称定后置 100mL 容量瓶中，加蒸馏水 50mL，摇匀后加水至刻度，40℃浸取 1h 后滤过。滤液即为粗酶提取液，供蛋白酶、淀粉酶活力和 pH 值的测定。

② 蛋白酶活力的测定 按福林-酚试剂比色法进行测定。酶液与底物酪蛋白作用后，生成的含酚基氨基酸和福林-酚试剂作用，呈蓝色反应，用紫外分光光度仪在 680nm 波长处测定吸光度。供试品酶液水解酪蛋白产生酪氨酸的量，可以由预先用各种不同浓度的酪氨酸对照品与福林-酚试剂反应后，所测得的吸光度（表 3-14）与对照品浓度所作的标准曲

线（图 3-40）中查得；或由回归方程计算求得，标准曲线方程：$y=593.60x+0.7394$，$r=0.9999$。

以在 40℃下，酶液每 1min 水解酪蛋白产生 1μg 酪氨酸的酶量，定义为一个酶活力单位（U）。

表 3-14 酪氨酸对照品溶液吸光度值

酪氨酸对照品溶液浓度/μg·mL⁻¹	0	50	100	150	200	250
吸光度	0.001	0.082	0.167	0.253	0.336	0.419

③ 淀粉酶活力的测定　酶液催化淀粉水解反应生成的葡萄糖用次碘酸法测定。以在 40℃、pH4.6 的条件下，酶液每 1h 水解可溶性淀粉产生 1mg 葡萄糖的酶量，定义为一个酶活力单位（U）。

（5）结果　见表 3-15。

表 3-15 红曲中蛋白酶、淀粉酶活力及酶液 pH 值的测定结果

编号	蛋白酶 /U·g⁻¹	淀粉酶 /U·g⁻¹	pH	编号	蛋白酶 /U·g⁻¹	淀粉酶 /U·g⁻¹	pH
H01	36	119	5.01	H08	37	44	4.23
H02	22	42	3.82	H09	48	67	4.15
H03	40	112	3.93	H10	57	51	3.97
H04	54	124	3.77	H11	75	88	4.26
H05	62	124	4.41	H12	82	105	4.51
H06	97	53	4.45	H18	210	194	4.56
H07	33	76	4.09				

【附】　自制的新红曲 H18 中两种酶的活力均高于各地来源的红曲商品药材，显示新红曲的品质较优。

6. 金银花

【来源】　本品为忍冬科植物忍冬（*Lonicera japonica* Thunb.）的干燥花蕾。

【同工酶电泳鉴别】

（1）材料　金银花栽培品：大毛花忍冬和鸡爪花忍冬（平邑县），从多年生群体中随机选取。

（2）仪器　PTC-100 型 PCR 仪（美国 PE 公司），WD-9403 型紫外透射反射仪。

（3）试剂　寡核苷酸引物：OPJ14 CACCCGGATG，OPJ16 CTGCTTAGGG，OPJ20 AAGCGGCCTC 等。

（4）方法

① RAPD 分析　样品 DNA 提取，按 CTAB 法。称取样品嫩叶各 50mg，置研钵中，加液氮少许研磨成匀浆状，移入 eppendorf 管中，再加入 100μL 预热至

60℃的CTAB提取液（2% CTAB、4mol/L氯化钠溶液、0.2%巯基乙醇、20mmol/L EDTA、100mmol/LTris，pH8.0），60℃保温30min，加入等体积的氯仿-异戊醇（29∶1）清洗两次，离心10min（9000r/min），取水相，加入2/3管体积的冷异丙醇，颠倒混匀。此时，会出现大量的纤维状DNA。将纤维状DNA小心挑至另一Eppendorf管中，用缓冲溶液（70%乙醇、10mmol/L醋酸钠）清洗一次，离心10min（9000r/min），弃去上清液，沉淀的DNA置冰箱中冷冻干燥。用50μLTE液溶解DNA，加1/10管体积的醋酸钠溶液（pH5.2）和95%乙醇沉淀DNA，离心5min（1400r/min），弃去上清液，用70%乙醇洗涤沉淀，净化台中自然干燥，然后溶于适量TE缓冲溶液中，置－20℃冰箱中保存备用。

② PCR反应条件　扩增反应液总体积15μL，含缓冲溶液（buffer）1.5μL，3mmol/L氯化镁溶液1.5μL，2.5mmol/L脱氧三磷酸核苷酸（dNTP）2μL，样品DNA 50ng和Taq DNA聚合酶1U，每份含随机寡核苷酸引物1个（15ng）。第1个循环在95℃变性5min，35℃退火2min，72℃延伸3min；后44个循环为94℃ 10s，38℃ 10s，72℃ 50s，最后于72℃保温5min，25℃退火5s。

③ 扩增产物的电泳　取扩增产物7～12μL，在1×TBE缓冲溶液1%琼脂糖凝胶中上样，电泳3～4h，溴化乙锭染色，紫外灯下观察，结果见图3-41。

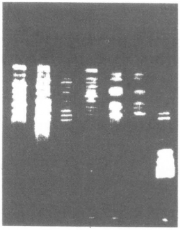


图3-41　金银花DNA电泳图谱

1，2—OPJ14；3，4—OPJ16；5，6—OPJ20；

M—100bp DNA Ladder；1，3，5—大毛花忍冬；2，4，6—鸡爪花忍冬

④ DNA指纹图谱　以泳道中各谱带的吸光度值 A 为纵坐标、谱带位置POS为横坐标绘制指纹图谱（图3-42）。

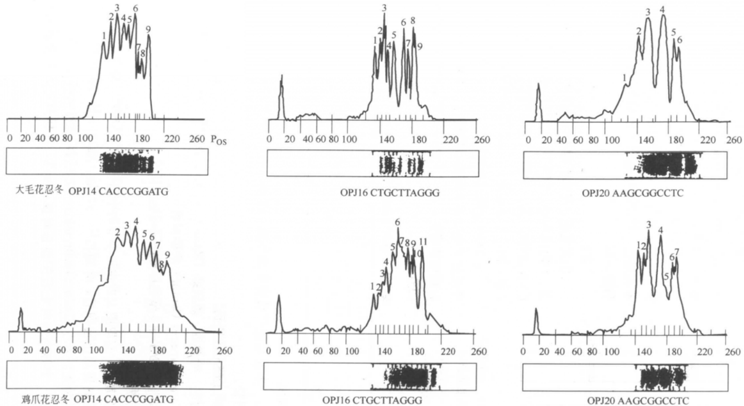


图 3-42 金银花 DNA 指纹图谱

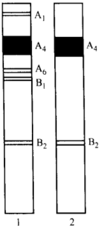


图 3-43 金银花同工酶电泳图谱
1—大毛花忍冬；
2—鸡爪花忍冬

⑤ POD分析　取以上样品（新鲜冷冻）1.0g，冰浴研磨，加入适量电极缓冲溶液（pH8.3），冰浴超声提取 30min，0℃离心 20min（8000r/min），上清液加等体积 40%蔗糖溶液混匀，置冰箱内冷藏，供点样用。聚丙烯酰胺凝胶电泳后，胶板用醋酸联苯胺显色，并计算样品谱带泳动率。结果见表 3-16 和图 3-43。

〖附〗

①大毛花忍冬共扩增 DNA 谱带 24 条：OPJ14 9 条、OPJ16 9 条、OPJ20 6 条。鸡爪花忍冬共扩增 DNA 谱带 26 条：OPJ14 8 条、OPJ16 11 条、OPJ20 7 条。两品系金银花 DNA 谱带有明显的差异。

② POD分析结果表明，大毛花忍冬与鸡爪花忍冬的过氧化物同工酶的谱带数目分别为 5 条和 2 条。根据电泳带谱，对以上两品系鉴别分析，取得良好的效果。

表 3-16　样品的泳动率（R_f）

谱　带	A_1	A_4	A_6	B_1	B_2
大毛花忍冬	0.05	0.19	0.31	0.35	0.65
鸡爪花忍冬	—	0.19	—	—	0.65

7. 哈蟆油

〖来源〗 本品是蛙科动物中国林蛙（*Rana temporaria chensinensis* David）的干燥输卵管。

〖酯酶同工酶电泳鉴别〗

（1）材料　哈蟆油，黑斑蛙（*Rana nigromaculata* Hallowell）、中华大蟾蜍（*Bufo bufo gargarzans* Cantor）的输卵管。

（2）仪器　DYY-Ⅲ8 型稳压稳流定时电泳仪等。

（3）方法

① 样品制备　选取肥大的生殖季节的中国林蛙、黑斑蛙、中华大蟾蜍的雌蛙，处死后剖腹取出输卵管，分别称取 1g，加入稀释 4 倍的浓缩胶缓冲溶液 5mL，研磨匀浆，离心 15min（4000r/min），取上清液置冰箱中备用。

② 电泳　电泳开始时电流控制在每板 20mA，待样品进入分离胶后加大至 40mA。

③ 染色脱色

a. 酯酶同工酶显色　取出一块胶板，加入酯酶显色液，25℃显色30min，用5%醋酸固定，4℃以下保存。

b. 可溶性蛋白质染色　取出另一块胶板，用水冲洗后加入考马斯亮蓝 R_{250} 溶液，37℃染色1h，然后用脱色液脱至谱带清晰，加入7%醋酸固定保存。

（4）结果　见图3-44。

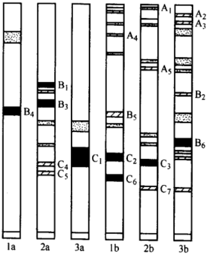


图3-44　哈蟆油等电泳图谱

a—酯酶同工酶显色；b—考马斯亮蓝 R_{250} 染色；

1—中国林蛙输卵管；2—黑斑蛙输卵管；3—中华大蟾蜍输卵管

【附】 哈蟆油的酯酶同工酶图谱共有2条谱带，与黑斑蛙（7条）、中华大蟾蜍（2条）之间的区别很明显。

8. 菟丝子

【来源】 本品为旋花科植物菟丝子（*Cuscuta chinensis* Lam.）的种子。

【同工酶电泳鉴别】

（1）材料　菟丝子、金灯藤（*C. japonica* Choisy）、大花菟丝子（*C. reflexa* Roxb.）的种子。

（2）试剂

① 聚丙烯酰胺凝胶　浓缩胶浓度4%，分离胶浓度因酶而异［过氧化物酶同工酶（POD）7%，谷草转氨酶同工酶（GOT）6%］。

② POD染色液配制　5mL联苯胺储存液＋2mL 3% H_2O_2＋93mL蒸馏水。

③ GOT染色液配制　吡哆醛-5′-磷酸盐2mg＋α-酮戊二酸200mg＋L-天冬氨酸400mg＋坚牢蓝BB 600mg＋0.2mol/L Tris-HCl缓冲溶液（pH8.0）100mL。

（3）方法

① 样品处理　用浓硫酸处理 20～30min 以打破休眠，用清水漂洗干净后把种子置于垫有潮湿滤纸的培养皿中，于 25℃生化培养箱中培养，每天光照 12h。约 3 天后待菟丝子茎尖从种皮中伸出时取幼苗制样。

② 酶液的制备　取菟丝子幼苗 0.5g，放入蒸馏水中冲洗，滤纸吸干后放入预冷的小研钵中，加 10 滴 1%β-巯基乙醇和 10 滴浓电极缓冲溶液，冰浴研磨匀浆，离心 10min（10000r/min），取上清液作酶液备用。

③ 电泳和染色　点样 50μL，用溴酚蓝作指示剂，用稳压稳流电泳仪稳流电泳，电泳开始，样品在浓缩胶时每槽电流为 1mA，到分离胶时加大电流至每槽 2mA，约需 5h 后当溴酚蓝移至离玻璃板下端 1cm 处时停止电泳。过氧化物酶同工酶（POD）染色，室温 5min；谷草转氨酶同工酶（GOT）染色，凝胶在染色液中于 37℃下恒温染色 10min。

将染完色的同工酶凝胶用 7%醋酸进行漂洗和固定；测定酶带迁移距离和指示剂迁移距离，计算相对迁移率（R_f 值）。

（4）结果　见图 3-45。

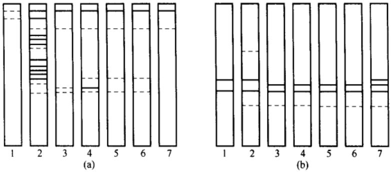


图 3-45　菟丝子同工酶电泳酶谱

（a）POD 酶谱；（b）GOT 酶谱

1—菟丝子 *Cuscuta chinensis* Lam.（云南省宾川县）；2—金灯藤 *C. japonica* Choisy（云南省景洪市）；3—大花菟丝子 *C. reflexa* Roxb.（云南省玉溪市）；4—大花菟丝子 *C. reflexa* Roxb.（云南省大理市）；5—大花菟丝子 *C. reflexa* Roxb.（云南省昆明市）；6—大花菟丝子 *C. reflexa* Roxb.（云南省呈贡县）；7—大花菟丝子 *C. reflexa* Roxb.（云南省路南县）

【附】　菟丝子共有 15 条 POD 酶带，其中 R_f 值为 0.059 的第一条酶带为所有样品所共有，是菟丝子的特征性谱带；菟丝子共有 5 条 GOT 酶带，R_f 值为 0.61 的酶带是菟丝子 GOT 的特征性谱带。菟丝子 1 号 2 条酶带，R_f 值为 0.54 和 0.61。金灯藤 2 号有 4 条酶带，R_f 值分别为 0.34、0.54、0.61 和 0.71。大花菟丝子 5 个样品中有 4 份的酶谱完全相同，均有 2 条强带和 1 条弱带；云南产大花菟丝子除具有这 3 条酶带外还具有 R_f 值为 0.54 的强带。

9. 延胡索

【来源】 本品为罂粟科植物延胡索（*Corydalis yanhusuo* W. T. Wang）的块茎。

【酯酶同工酶电泳鉴别】

（1）材料　延胡索、白花土元胡（*Corydalis humosa* Migo.）和全叶土元胡（*C. repens* Mandl et Muhld var. *humosoides* Y. H. Zhang）的块茎，块茎培养萌发后取根尖做染色体试验，取开花前叶片做同工酶试验。

（2）方法

① 染色体试验　按常规方法取材（块茎长出的幼根根尖）；预处理（35μg/g 放线菌酮处理液处理 4～5h）；固定（卡诺液）；解离（1mol/L 盐酸 60℃下约 6min）；染色（改良苯酚品红染液）；压片和镜检并永久封片。计数 20 个分散良好的细胞并选取最佳者显微摄影和保存。

② 过氧化物酶同工酶分析

a. 样品制备　取开花前植株中部叶片称取 1g，加 1mL 双蒸水在冰浴上研磨成匀浆，离心 15min（6000r/min），取上清液备用。

b. 电泳　采用垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳法，分离胶浓度为 7.5%，浓缩胶浓度约为 2.5%（pH6.7），每孔加样 50μL，电极缓冲溶液为 Tris-甘氨酸缓冲溶液（pH8.3），溴酚蓝作电泳指示剂，采用稳压电泳，电压 15V/cm，电泳约 7h，在 4℃冰箱中进行。

c. 染色　采用醋酸联苯胺染色法，染色 5～10min，然后用水反复漂洗，停止染色，照相，并用 10%甘油溶液制成干胶片保存。

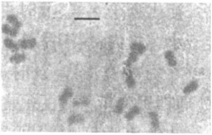


图 3-46　白花土元胡的染色体

（3）结果　白花土元胡和全叶土元胡的染色体数目（图 3-46）：$2n=16$。过氧化物酶同工酶酶谱见图 3-47。

【附】

① 白花土元胡和全叶土元胡的过氧化物酶同工酶谱型有很大不同。白花土元胡的谱型为叶具 1 条二级酶带；块茎具 9 条酶带，1 条一级，7 条二级，1 条三级。全叶土元胡谱型为叶具 2 条酶带，1 条二级，1 条三级；块茎具 6 条酶带，2 条一级，4 条二级。两者的谱型表明，叶的酶谱带较少，块茎的酶谱带较多。

② 慢速区有 3 条酶带（R_f：0.159、0.180、0.238），属白花土元胡 1 条（A_2），全叶土元胡 2 条（A_1、A_3），种间无一酶带相同；中速区有 8 条酶带（R_f：0.414、0.468、0.494、0.505、0.515、0.537、0.546、0.579），属白花土元胡 5 条

(B_1、B_3、B_5、B_7、B_8)，全叶土元胡 3 条（B_2、B_4、B_6），种间无一酶带相同；快速区有 5 条酶带（R_f：0.610、0.612、0.650、0.670、0.700），属白花土元胡 3 条（C_1、C_4、C_5），全叶土元胡 2 条（C_2、C_3），种间无一酶带相同。

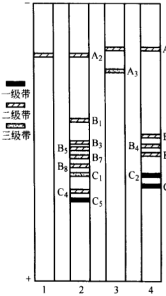


图 3-47　延胡索过氧化物酶同工酶酶谱

1—白花土元胡叶；2—白花土元胡块茎；

3—全叶土元胡叶；4—全叶土元胡块茎

10. 贝母

【来源】 本品为百合科植物甘肃贝母（*Fritillaria przewalskii* Maxim.）等的鳞茎。

【酯酶同工酶的电泳鉴定】

（1）材料　样品来源及居群编号见表 3-17。

表 3-17　样品来源

居群编号	种　名	地　点	海拔高度/m
1	甘肃贝母 *Fritillaria przewalskii* Maxim. ex Batal	永登县	2650
2	太白贝母 *F. taipaiensis* P. Y. Li	西和县	1540
3	太白贝母 *F. taipaiensis* P. Y. Li	西和县	2300
4	甘肃贝母 *F. przewalskii* Maxim. ex Batal	舟曲县	4000
5	舟曲贝母 *F. taipaiensis* var. *zhouquensis*	武都县	2500
6	太白贝母 *F. taipaiensis* P. Y. Li	文县	3000
7	暗紫贝母 *F. unibracteata* Hsiao et K. C. Hsia	舟曲县	3000
8	甘肃贝母 *F. przewalskii* Maxim. ex Batal	舟曲县	3500
9	舟曲贝母 *F. taipaiensis* var. *zhouquensis*	舟曲县	2600
10	陇南贝母 *F. gansuensis*	舟曲县	3050

续表

居群编号	种　　名	地　点	海拔高度/m
11	甘肃贝母 *F. przewalskii* Maxim. ex Batal	迭部县	3300
12	甘肃贝母 *F. przewalskii* Maxim. ex Batal	岷县	2600
13	甘肃贝母 *F. przewalskii* Maxim. ex Batal	岷县	2400
14	榆中贝母 *F. yuzhongensis*	榆中县	3200
15	甘肃贝母 *F. przewalskii* Maxim. ex Batal	永登县	2700
16	甘肃贝母 *F. przewalskii* Maxim. ex Batal	舟曲县	3100
17	甘肃贝母 *F. przewalskii* Maxim. ex Batal	漳县	3900
18	漳县贝母 *F. przewalskii* cv. *zhangxian*	漳县	2700
19	伊贝母 *F. pallidiflora* Schrenk	兰州大学	1500

（2）方法

① 样品的制备　样品用蒸馏水洗净、称重，于4℃冰箱中冷冻2h后，按0.5mL/g加蒸馏水制成匀浆，室温下离心20min（4000r/min）。取上清液，计量加入蔗糖，使糖的终浓度为20%，置于4℃冰箱中保存备用。

② 同工酶的电泳　采用垂直平板梯度聚丙烯酰胺凝胶电泳法（PoroPAGE）。胶浓度6%～9%。电泳时，每个试样槽加样品液30μL，加1滴溴酚蓝作前沿指示剂。稳流，开始时每个试样槽供给电流0.1mA/mm²（按每平方毫米0.1mA供电），10min后将电流加大1倍。待电泳前沿距胶下端1cm时，切断电源，取出胶板染色。岛津CS-910双波长色谱扫描仪扫描［测定波长（λ_S）595nm，参比波长（λ_R）760nm］。酶带相对迁移率（R_f）＝酶带迁移距离/溴酚蓝迁移距离。

（3）结果　见图3-48、表3-18，表3-19，图3-49。

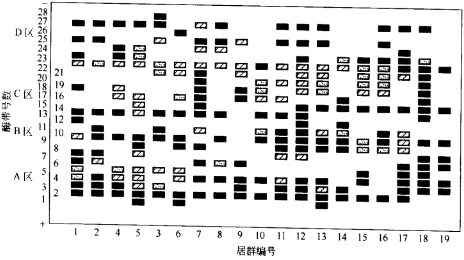


图3-48　贝母属19个居群的酯酶同工酶电泳图谱（居群编号同表3-17）

■ 强带；▨ 次强带；▭ 弱带

表 3-18 酯酶同工酶的酶带及其迁移率（R_f）

酶带号数 Est 迁移率	1 0.887	2 0.865	3 0.831	4 0.809	5 0.787	6 0.764	7 0.742
酶带号数 Est 迁移率	8 0.708	9 0.674	10 0.652	11 0.629	12 0.596	13 0.562	14 0.528
酶带号数 Est 迁移率	15 0.494	16 0.472	17 0.449	18 0.427	19 0.404	20 0.382	21 0.360
酶带号数 Est 迁移率	22 0.337	23 0.292	24 0.258	25 0.255	26 0.157	27 0.112	28 0.067

注：酶带号数同图 3-48。

表 3-19 8 种贝母酯酶同工酶的相似度指数

居群号	2	7	9	10	14	18	19
1	0.53	0.41	0.39	0.41	0.56	0.70	0.35
2		0.29	0.43	0.43	0.50	0.46	0.55
7			0.44	0.37	0.33	0.64	0.35
9				0.46	0.33	0.35	0.39
10					0.55	0.39	0.42
14						0.41	0.39
18							0.40

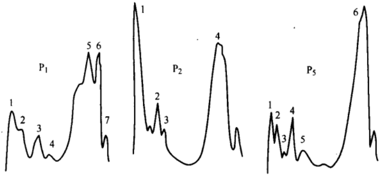


图 3-49 贝母植物酯酶同工酶的色谱扫描（λ=595nm）

P_1—甘肃贝母；P_2—太白贝母；P_5—舟曲贝母

【附】

① 贝母类植物的酯酶同工酶酶带共有 28 条，主要集中在快带区。各酶带的 R_f 见表 3-18。这 28 条同工酶谱带，按其聚集的程度及显示的顺序，从正到负可以将各个酶谱分成 A、B、C、D 等 4 个区域。A 区共 7 条酶带，R_f=0.887～0.742；B 区共 5 条酶带，R_f=0.708～0.596；C 区共 10 条酶带，R_f=0.562～0.337；D 区共 6 条酶带，R_f=0.292～0.067。

② 贝母植物酯酶同工酶都具有 C_{22}带（R_f0.337）、A_2 带（R_f0.865）、A_7 带（R_f0.742），并且 A_3、B_{12}带出现的频率（95%）也较大，这些带可能是贝母属植物的特征带，具有属的特异性。

③ 将不同种类的贝母酯酶同工酶酶谱作比较，可得到，甘肃贝母大都能显出明显的 14～15 条带；D_{25}带在其他种类没有，可以作为此种的特征带；A_7 带深红色，A_2 带深紫褐色，其余各带呈褐色。太白贝母的 11 条带大都集中在 A 区和 B 区，各带的强弱、颜色均有差异，其中 A 区各带棕红色，其余各区酶带紫色或紫红色；C 区分带较少，为弱带或次强带，C_{22}为弱带；这可能是太白贝母的特异性，具有很大的分类价值。暗紫贝母、漳县贝母与甘肃贝母的酶谱相似，在 C 区分布较多，这说明 3 个种（变种）亲缘关系较近，具有很大的同源性。舟曲贝母在 C 区有 2 条紫褐色的强带，没有 B_{12}带，与其他种差别明显。伊贝母的酯酶同工酶与其他种存在较大差异；A_2 带较宽，深紫褐色；酶带集中在 A 区和 B 区，C 区只有 1 条次强带，而 D 区则无酶带出现；说明伊贝母是一个非常自然的类群，与其他种的亲缘关系较远。榆中贝母作为甘肃的特有分布种，在同工酶酶谱上也有它的特异性；共有 10 条酶带，其中有 7 条强带，1 条次强带和 2 条弱带；A_2 带深红色，较宽，可能是其特征带，其余各带呈紫色。

④ 根据 Vaughan 公式计算 8 种贝母植物的相似度指数（表 3-19）。结果表明，甘肃贝母与漳县贝母的相似度指数为 0.70，漳县贝母与暗紫贝母的相似度指数为 0.64，相似性较大，这说明它们是近缘种；而甘肃贝母与伊贝母、暗紫贝母与太白贝母，相似度指数均在 0.35 以下，说明它们的亲缘关系疏远。

⑤ 色谱扫描曲线（图 3-49）也显示出种间差别。甘肃贝母（P_1）的第 5 酶带峰高并紧挨第 6 酶带。太白贝母（P_2）的第 1 酶带峰远高于其他种贝母，并且酶带数量少。舟曲贝母（P_5）的第 1 酶带峰低，而第 6 峰最高，与太白贝母明显不同。

11. 榆耳

〖来源〗 本品为革菌科榆耳（*Gloestereum incqmatum* S. Ito & Imai）的干燥子实体。

〖酯酶同工酶电泳鉴别〗

（1）材料 供试菌种及来源：U_{01}（辽宁省新宾县黄旗寨），U_{02}、U_{03}、U_{04}、U_{05}、U_{06}、U_{10}（辽宁省清源县不同生态环境条件下的榆树庄），U_{08}（辽宁省抚顺县），U_{07}、U_{09}（中国科学院沈阳应用生态所菌种组提供）。

（2）方法

① 培养基

a. 斜面固体培养基 20% 土豆汁 100mL，葡萄糖 1g，酵母膏 0.15g，KH_2PO_4 0.3g，$MgSO_4$ 0.15g，pH6.0，琼脂 1.8g。

b. 液体发酵培养基　培养基成分与斜面固体培养基相同，但不加琼脂。

② 菌丝体培养及新鲜子实体样品采集　将已在斜面培养基上活化的榆耳菌丝体接种于盛 100mL 液体培养基的 500mL 三角瓶中，28℃静置培养 10 天后得到榆耳菌丝体，供进一步实验用。取生长旺盛的新鲜榆耳子实体，于 4℃冰箱保存备用。

③ 粗酶提取　将经培养获得的菌丝体滤过，然后用蒸馏水进行 3～4 次洗涤，将表面的培养基残液清洗干净，最后用滤纸将其表面的水分吸干。称取 2g（湿重）菌丝体，用干净剪刀将其剪碎，并置于干净的研钵中，加入预冷的 0.1mol/LTBE 提取缓冲溶液（Tris-H_3BO_4-EDTA）4mL，然后将研钵置于 －10℃冷冻 24h 后进行冰研。反复进行两次，再将上述样品在低温下进行超声波破碎（Css-200 型超声波粉碎机），250mA，15min，最后于 4℃离心 15min（10000r/min），取上清液于冰箱保存备用。取新鲜子实体样品 2g，处理方法同菌丝体的处理方法。

④ 电泳及其染色　聚丙烯酰胺凝胶圆盘式及夹心垂直板式电泳。浓缩胶浓度 3%，pH6.7；分离胶浓度 7.5%，pH8.9；电极缓冲溶液采用 Tris-Gly 系统，pH8.3；加样量 50μL，稳压电流 3mA，电泳时间 1.5～2h。染色采用醋酸-α-萘酯坚牢蓝系统。得到酯酶凝胶图谱，并在双波长薄层扫描仪上进行扫描。

（3）结果　见表 3-20、图 3-50、图 3-51、图 3-52。

表 3-20　榆耳不同菌株酯酶同工酶酶谱 R_f 值

R_f	菌株									
	U_{01}	U_{02}	U_{03}	U_{04}	U_{05}	U_{06}	U_{07}	U_{08}	U_{09}	U_{010}
0.17						+				
0.21						+				
0.25	+		+		+	+		+	+	
0.30						+	+	+	+	+
0.37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.49	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.61	+			+	+	+		+	+	+
0.66	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.73		+		+		+		+	+	+
0.78		+	+	+	+				+	

〖附〗　在相同的培养条件下，供试的 10 株榆耳菌株的酯酶同工酶酶谱有着明显的差别。但是，他们存在着共有的 3 条谱带，分别为 R_f 为 0.37、0.49、0.66，这 3 条谱带的活性都很强，且非常稳定，是榆耳的特征性谱带。

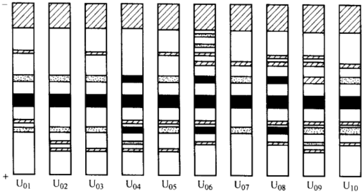


图 3-50　榆耳不同菌株酯酶同工酶酶谱模式图

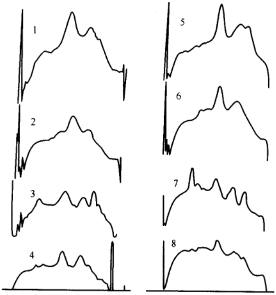
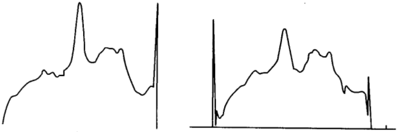


图 3-51　榆耳子实体不同生长时期酯酶同工酶扫描曲线

1—U_{04}原基生长期；2—U_{04}旺盛生长期；3—U_{04}衰老生长期；4—U_{04}再生长期；5—U_{06}原基生长期；6—U_{06}旺盛生长期；7—U_{06}衰老生长期；8—U_{06}再生长期



(a)　　(b)

图 3-52　榆耳子实体不同部位酯酶同工酶扫描曲线

(a)—U_{04}生长旺盛时期子实体的边缘部位样品；(b)—U_{04}生长旺盛时期子实体的中心部位样品

12. 黄芪

【来源】 本品为豆科植物膜荚黄芪［*Astragalus membranaceus*（Fisch.）Bge.］和蒙古黄芪［*Astragalus monhulicus*（Fisch.）Bge. var. *mongholicus*（Bge.）Hsiao］的干燥根。

【酯酶同工酶电泳鉴别】

（1）方法

① 样品液制备 选取整齐一致的叶片，称取 0.5g，于水浴中用组织匀浆器磨碎。根样剥取其幼根的皮部、剪碎混匀，称取 1g，在冰浴条件下，放入研钵内研碎。叶、根均按 1∶1∶1 的比例加入 Tris-柠檬酸（pH8.9）缓冲溶液和 1%的甘油，离心 5min（4000r/min），取其上清液放入冰箱中备用。

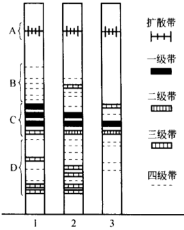


图 3-53 黄芪酯酶同工酶酶谱

1—模式图；2—膜荚黄芪（东北产）；3—蒙古黄芪（衡山产，绿杆芪）

② 电泳 用 10%的分离胶，4%的浓缩胶，每个点样槽中加 50μL 的样品，用溴酚蓝作指示剂，置 1～4℃的冰箱中电泳，稳定电压 260V，待电泳至指示剂距下层电泳液 1cm 时停止电泳，然后用醋酸-α-萘酯和快速考马斯亮蓝染色法染色，制成干板后，同时测样品谱带。

（2）结果 见图 3-53。

【附】 黄芪的酯酶同工酶酶谱可分为 A、B、C、D 等 4 个谱带区，A 区为扩散区。B 区一般有 2～6 条浅带，R_f 值为 0.36～0.52。C 区显示出 4 条带，R_f 值为 0.54～0.66，该区第 1 条、第 2 条主酶带着色较深，属一级谱带，少数为二级谱带，第 3 条酶带也有一级谱带出现，供试样品的酯酶同工酶谱带在 C 区表现基本一致，由此认为，C 区是黄芪的特征性谱带区，也称主谱带区。D 区一般为 3～9 条带，着色较浅，为三级、四级谱带，R_f 值为 0.68 以上。

13. 鱼腥草

【来源】 本品为三白草科植物蕺菜（*Houttuynia cordata* Thunb.）的干燥全草。

【同工酶电泳鉴别】

（1）材料 样品采自四川省和重庆市，共 90 个不同居群，其中峨眉蕺菜居群 2 个、蕺菜居群 88 个（见表 3-21）。

（2）方法

表 3-21 川产鱼腥草种质资源的过氧化物酶和酯酶同工酶变异类型

编号	材料号	来源	过氧化物酶同工酶	酯酶同工酶	编号	材料号	来源	过氧化物酶同工酶	酯酶同工酶
1	W01-86[①]	峨眉山、栽培	A	D	46	W01-108	雅安、野生	D	C
2	W01-1[①]	乐山、栽培	D	A	47	W01-37	酉阳、野生	A	C
3	W01-4	乐山、栽培	A	D	48	W01-58	剑阁、野生	D	I
4	W01-5	犍为、栽培	C	E	49	W01-59	剑阁、野生	B	B
5	W01-9	井研、野生	A	D	50	W01-78	盐亭、野生	B	A
6	W01-20	宜宾、野生	A	D	51	W01-96	峨眉、野生	D	H
7	W01-23	宜宾、野生	D	D	52	W01-104	中江、栽培	A	C
8	W01-24	宜宾、野生	A	D	53	W01-107	雅安、栽培	D	C
9	W01-25	宜宾、野生	A	D	54	W01-18	高县、野生	C	B
10	W01-48	内江、野生	A	D	55	W01-62	旺苍、野生	B	B
11	W01-50	内江、野生	A	D	56	W01-66	南江、野生	B	J
12	W01-39	彭水、野生	A	D	57	W01-79	盐亭、野生	D	H
13	W01-43	马尔康、栽培	D	E	58	W01-45	汶川、野生	B	D
14	W01-97	芦山、栽培	A	E	59	W01-46	都江堰、野生	D	D
15	W01-105	雅安、野生	A	D	60	W01-51	绵阳、野生	D	D
16	W01-11	井研、栽培	D	C	61	W01-56	剑阁、野生	B	C
17	W01-38	黔江、野生	D	F	62	W01-68	南江、野生	D	C
18	W01-52	绵阳、野生	D	D	63	W01-92	资阳、栽培	D	H
19	W01-55	剑阁、野生	D	C	64	W01-13	荣县、野生	B	C
20	W01-63	旺苍、野生	D	G	65	W01-34	秀山、野生	A	C
21	W01-81	荥经、野生	D	I	66	W01-57	剑阁、野生	D	I
22	W01-106	雅安、野生	D	D	67	W01-64	旺苍、栽培	D	G
23	W01-16	宜宾、野生	A	J	68	W01-98	雅安、野生	D	D
24	W01-69	巴中、野生	D	B	69	W01-65	旺苍、野生	B	A
25	W01-80	绵阳、野生	A	H	70	W01-83	南充、野生	D	D
26	W01-2	乐山、栽培	D	C	71	W01-99	资阳、野生	D	D
27	W01-3	乐山、野生	D	C	72	W01-10	井研、栽培	F	B
28	W01-6	犍为、野生	A	C	73	W01-12	荣县、野生	B	C
29	W01-7	沐川、野生	C	D	74	W01-14	荣县、栽培	B	D
30	W01-8	乐山、野生	E	D	75	W01-53	绵阳、栽培	D	D
31	W01-15	自贡、栽培	B	C	76	W01-60	广元、野生	B	B
32	W01-19	宜宾、野生	D	D	77	W01-61	广元、野生	B	D
33	W01-29	南溪、栽培	A	C	78	W01-67	南江、野生	B	J
34	W01-30	南溪、栽培	B	C	79	W01-70	巴中、栽培	D	D
35	W01-31	隆昌、野生	E	E	80	W01-74	南部、野生	D	D
36	W01-41	名山、野生	D	D	81	W01-75	南部、野生	D	D
37	W01-42	名山、野生	D	D	82	W01-93	雅安、野生	D	C
38	W01-47	康定、野生	D	G	83	W01-94	雅安、野生	D	C
39	W01-54	梓潼、野生	B	C	84	W01-100	邛崃、野生	D	D
40	W01-71	巴中、野生	D	D	85	W01-101	雅安、野生	A	C
41	W01-72	仪陇、野生	D	G	86	W01-103	青城山、野生	D	C
42	W01-73	南部、野生	B	E	87	W01-110	雅安、野生	D	C
43	W01-76	盐亭、野生	A	C	88	W01-112	雅安、野生	A	C
44	W01-77	盐亭、野生	A	C	89	W01-113	雅安、野生	D	C
45	W01-95	芦山、栽培	A	E	90	W01-102	雅安、野生	A	C

① 为峨眉蕺菜。

① 样品处理　将 90 居群样本种植实验地，于早晨 9～10 点取新鲜成熟叶片 0.5g，液氮研磨，加 1mL 提取液（1mol/LTris-HCl pH8.0，20mmol/L EDTA pH8.0）混匀后离心 10min(3500r/min)，取上清液于－20℃低温下保存备用。

② 电泳　垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳。取上清液加等体积上样缓冲溶液（80%蔗糖，0.5%溴酚蓝）混匀，每槽点样 30μL，每板胶第一槽均点居群 WOl-5 的提取液作对照。聚丙烯酰胺凝胶浓缩胶浓度为 3.1%(pH6.7)，分离胶浓度为 7.2%(pH8.9)，电极缓冲溶液为 Tris-甘氨酸(pH8.3)。在 0～4℃恒温下，初始电压 180V，等指示剂过浓缩胶后加至 220V 稳压直至指示剂离底部 1cm 左右结束电泳。

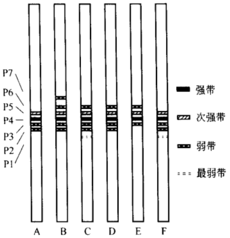


图 3-54　鱼腥叶片过氧化物酶酶谱模式图

③ 染色　酯酶采用醋酸-萘酯-坚牢蓝 RR 盐染色法，37℃恒温染色 30min；过氧化物酶用醋酸联苯胺染色法，37℃下染色 10min。二者均用 7%冰醋酸固定，清水漂洗，观察统计结果。

(3)结果　见表 3-22，图 3-54，表 3-23，图 3-55。

表 3-22　过氧化物酶酶带在 90 个居群中的分布频率

酶带	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
迁移率	0.61	0.58	0.55	0.52	0.50	0.47	0.43
出现频率/%	4.44	97.78	100	100	100	72.22	18.89

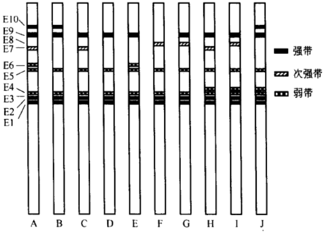


图 3-55　鱼腥草叶片酯酶酶谱模式图

表 3-23 酯酶同工酶酶带在 90 居群中的分布频率

酶带	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8	E9	E10
迁移率	0.57	0.55	0.54	0.53	0.42	0.40	0.32	0.30	0.26	0.22
出现频率/%	100.00	100.00	100.00	11.11	100.00	100.00	38.89	8.89	98.89	13.33

〖附〗

① 鱼腥草叶片过氧化物酶同工酶变异类型　峨嵋蕺菜和蕺菜酶谱间无显著差异，无特征带可将二者严格区分。所有居群叶片过氧化物酶同工酶酶谱可划为 A、B、C、D、E 和 F 型共 6 种类型。峨眉蕺菜中，峨眉居群为 A 型谱带，乐山居群为 D 型谱带。蕺菜中，具 D 型酶谱的居群最多，包括居群 WO1-23、WO1-43、WO1-11 和 WO1-38 等共 42 个居群，占蕺菜总居群数的 47.73%。其次为具 A 型酶谱的居群共 23 个，占 26.14%；具 B 型谱带居群有 17 个，占 19.32%；具 C 型、E 型和 F 型酶谱的居群各有 3、2 和 1 个，分别占 3.41%、2.27%和 1.14%。野生居群和栽培居群的过氧化物酶酶谱类型一致。

② 酶带特征及分布频率　从 6 种类型过氧化物酶同工酶谱图中可以看出，鱼腥草种质资源共电泳出 7 条过氧化物酶同工酶酶带，酶带比较集中，其迁移率变化范围 0.61～0.43，每个类型分别具 4～6 条酶带。过氧化物酶酶带在 90 个居群中的分布频率表明，酶带 P3（R_f0.55）、P4（R_f0.52）和 P5（R_f0.50）在所有居群中均出现，P2（R_f0.58）在 97.78%的居群中出现，为鱼腥草资源中比较稳定的酶带。P6、P7 和 P1 在不同居群间变化相对较大，出现频率分别为 72.22%、18.89%和 4.44%。

③ 不同酶谱类型的地理分布　鱼腥草过氧化物酶酶谱类型中，具 5 条酶带的 D 型酶谱分布范围，除纬度特别偏南的宜宾、高县、酉阳和秀山等地，几乎在各材料采集地均有。B 型酶谱（6 条酶带）主要分布在北部的梓潼、剑阁、广元、旺苍、南江和仪陇等地。具 6 条酶带的 C 型酶带则集中分布在川南的犍为、沐川和高县等地。A 型酶谱（4 条酶带）绝大部分分布在纬度偏南地区。E 型（4 条酶带）酶谱也主要分布在四川南部的乐山和隆昌等地。由此说明，过氧化物酶酶谱类型同地理分布有一定关系，其酶带数在纬度偏北地区相对较多，偏南地区相对较少。

④ 酯酶同工酶酶谱类型　从鱼腥草资源的叶片酯酶同工酶变异类型可以看出，峨眉蕺菜和蕺菜居群酯酶酶谱间无显著差异，也无特征带可将二者严格区分。所有居群的酯酶酶谱可划为 A、B、C、D、E、F、G、H、I 和 J 型共 10 种类型。峨眉蕺菜中，四川乐山居群为 A 型谱带，峨眉居群为 D 型谱带。蕺菜中具 D 型酶谱的居群最多，包括居群 WO1-4、WO1-9、WO1-20 和 WO1-23 等共 31 个，占蕺菜总居群数的 35.23%；其次 28 个居群具 C 型酶谱，占 31.82%；

具B型和E型谱带居群各有6个，分别占6.82%；G型和H型谱带的居群各4个，分别占4.55%；I型和J型酶谱居群各3个，分别占3.41%；A型酶谱2个，占2.27%，具F型酶带的居群最少，仅黔江居群WO1-38，占1.11%。野生居群和栽培居群的酯酶酶谱类型一致。

⑤ 酯酶酶带特征及分布频率　10种类型酯酶同工酶谱图可以看出，鱼腥草电泳出10条酯酶酶带，大致可分为快、中和慢3个区：快区包括谱带E1、E2、E3和E4，迁移率分别为0.57、0.55、0.54和0.53；中区包括E5和E6，迁移率分别为0.42和0.40；谱带E7、E8、E9和E10在慢区，迁移率分别为0.32、0.30、0.26和0.22。每种类型分别具5～8条酶带。

酯酶酶带的分布频率：酶带E1、E2、E3和E5在所有居群中均出现；E9在98.89%的居群中出现，为鱼腥草比较稳定的酶带；其余酶带在不同居群中变化较大，E7在38.89%的居群中出现，E10、E4和E6的出现频率分别为13.33%、11.11%和10.00%；仅8个居群中有酶带E8，出现频率为8.89%。

14. 麦冬

【来源】 本品为百合科植物麦冬［*Ophiopogon japonicus*（Thunb.）Ker.-Gawl.］的块根。

【同工酶电泳鉴别】

（1）材料　四川产的麦冬（川麦冬）：①大叶型，叶片宽大、叶色深绿色，分蘖力强，株型紧凑，叶片直立生长，稍下垂，块根颗粒大，呈纺锤形；②小叶型，叶片狭小，株型松散，块根颗粒小，呈长椭圆形；③直立型，叶色浅绿色，叶片直立生长，块根颗粒大而少，块根呈椭圆形。

（2）方法

① 样品处理　将3种类型麦冬整株保湿带回实验室，洗净泥沙，擦干水分，剪碎称量1g于研钵中，加入0.02mol/L Tris-甘氨酸pH8.7的提取液5mL，在冰浴中研磨匀浆，离心20min（4500r/min），取上清液存于－10℃条件下备用。

② 电泳　过氧化物同工酶电泳的凝胶浓度为8%，电流强度35mA，点样20μL，电泳4h。酯酶同工酶凝胶浓度为12%，电流强度35mA，电泳3.5h。

③ 染色　过氧化物同工酶采用改良醋酸联苯胺染色3min，酯酶同工酶采用醋酸-α-萘酯染色30min。染色后经清水漂洗脱色，再摄影。

（3）结果　见图3-56。

【附】

① 品种间过氧化物同工酶分析　过氧化物同工酶3个类型表现一致，根据染色深浅，共分离出14条酶带［见图3-57（a）］，R_f＝0.05～0.858，R_f＝0.358为大叶型与直立型所共有，而R_f＝0.671又为大叶型与小叶型所共有。表明3个类型间酶带有交叉重叠现象，R_f＝0.838带大叶型与小叶型均表现为中强带，而

直立型表现为弱带。

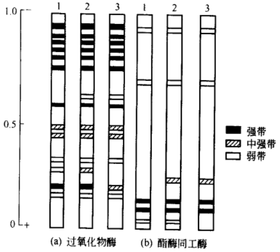


图 3-56　麦冬同工酶电泳图谱

1—小叶型；2—大叶型；3—直立型

② 品种间酯酶同工酶分析　共分离出 6 条酶带，$R_f=0.078\sim0.925$，其中 $R_f=0.078$，$R_f=0.264$，$R_f=0.271$，$R_f=0.250$，4 条酶带为 3 个类型所共有，$R_f=0.693$ 带为大叶型与直立型所共有，小叶型则缺此带，$R_f=0.851$ 带又为小叶型与大叶型所共有，直立型则缺此带。

15. 天麻

【来源】 本品为兰科植物天麻(*Gastrodia elata* Blume) 的块茎。

【同工酶电泳鉴别】

(1) 材料　白麻及其变异类型（1～3 为红秆天麻，4、5 为绿秆天麻，6～8 为乌秆天麻，9、10 为东北天麻）。

箭麻和花序：1～7 号样品（陕西宁强县山地野生），8～15 号样品（北京西北旺药用植物研究所天麻栽培基地），见表 3-24。

表 3-24　箭麻和花序样品的来源及主要特点

样品号	变异类型	生态	花茎色	花色	样品号	变异类型	生态	花茎色	花色
1、2	红秆天麻	野生	红	橙红	11	乌红秆天麻	栽培	红	淡灰
3	绿秆天麻	野生	绿	蓝绿	12	红秆天麻	栽培	红	橙红
4～7	乌秆天麻	野生	深灰	灰黄	13	淡红秆天麻	栽培	淡红	黄绿
8～9	乌秆天麻	栽培	深灰	灰黄	14	蓝秆天麻	栽培	深蓝	淡绿
10	绿秆天麻	栽培	绿	蓝绿	15	淡绿秆天麻	栽培	淡绿	黄绿

注：样品 12～15 为天麻种内杂交后 F_1 代表型。

（2）方法

① 样品制备

a. 白麻样品的制备　取洗净削去表皮的白麻约 1g，放入冰冻的盛有 1mL 稀释 4 倍的浓缩胶缓冲溶液的研钵中，先将其研磨成糊状，然后移至离心管中，低温离心 18min（9000r/min），取上清液 0.5mL，再加入等体积 10％甘油溶液，作为样品溶液。

b. 箭麻样品的制备　取洗净的削去表皮的箭麻约 1g，其他方法同白麻。

c. 花序样品的制备　取抽苔开花期的花序顶部大约 1g，其他方法同白麻。

② 聚丙烯酰胺凝胶板制备　分离胶浓度为 7.5％，浓缩胶浓度为 3％。

③ 电泳　点样 40μL，刚开始电流强度为 10mA，5min 以后增大到 20mA，整个过程维持电流强度不变，当前沿指示剂迁移到距离凝胶底部约 1cm 处，停止电泳。整个电泳过程在 4℃冰箱中进行，大约需要 2.5h。

④ 过氧化物酶同工酶的显色　将电泳后的凝胶板浸入 0.1％联苯胺溶液中，滴加少量过氧化氢，迅速混匀，进行显色，显色完后，漂去染色液，将凝胶板放水中保存。

⑤ 可溶性蛋白的显色　将电泳后凝胶板浸入 0.1％考马斯亮蓝-甲醛-醋酸水溶液中，于 37℃水浴中染色约 1h，然后用 20％甲醇＋7％醋酸水溶液脱色，不断更换脱色液，至背景清晰，放入 7％醋酸水溶液中保存。

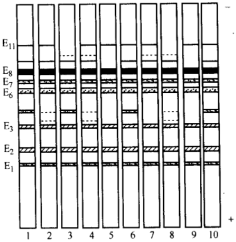


图 3-57　天麻白麻期可溶性蛋白电泳图谱

■最深；▨较深；▤较浅；----最浅；

1～3—红秆天麻；4，5—绿秆天麻；

6～8—乌秆天麻；9，10—东北天麻

⑥ 酯酶同工酶的染色　将电泳后凝胶板浸渍于醋酸-α-萘酯、醋酸-β-萘酯和坚牢蓝的混合显色液中充分显色，显色后漂去显色液，将凝胶板放水中保存。

（3）结果

① 天麻在白麻阶段酶活性很低，过氧化物酶同工酶在显色液中至少显色 1h，才隐约可见酶带出现，而且很不清晰。此阶段可溶性蛋白的染色较好（图 3-57）。

② 天麻在箭麻阶段，其酶活性仍然较低，但比白麻阶段的酶活性略高。过氧化物酶同工酶在显色液中大约显色 30min 便可见酶带出现（图 3-58），但酶谱仍不清晰。可溶性蛋白谱带较白麻阶段多（图 3-59）。

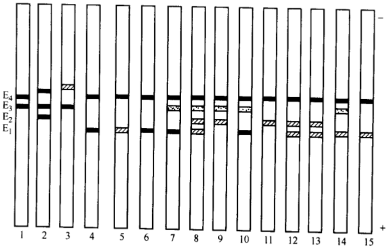


图 3-58　天麻（在箭麻阶段）不同变异类型过氧化物酶同工酶电泳图谱

1,2,12—红秆天麻；3,10—绿秆天麻；4～9—乌秆天麻；

11—乌红秆天麻；13—淡红秆天麻；14—蓝秆天麻；15—淡绿秆天麻

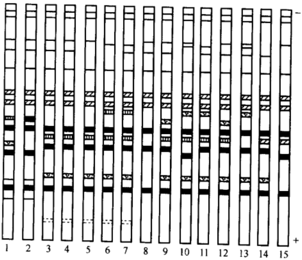


图 3-59　天麻（在箭麻阶段）不同变异类型可溶性蛋白电泳图谱

1,2,12—红秆天麻；3,10—绿秆天麻；4～9—乌秆天麻；

11—乌红秆天麻；13—淡红秆天麻；14—蓝秆天麻；15—淡绿秆天麻

③ 正在抽苔开花的花序，酶活性较高，过氧化物酶同工酶大约需要 15min 酶带便清晰可见，不同样品过氧化物酶同工酶的迁移率和酶带数见表 3-25。该阶段的可溶性蛋白的谱带数也较清晰。

④ 不同天麻样品的酯酶同工酶电泳图谱见图 3-60，酯酶同工酶带迁移率及其酶带数见表 3-26。

表 3-25　不同样品过氧化物酶同工酶的迁移率和酶带数

样品号	E_1	E_2	E_3	E_4	E_5	E_6	总酶带数
1	—	—	0.39	0.34	—	—	2
2	—	0.44	0.39	—	0.33	—	3
3	—	—	0.39	—	—	0.31	2
4	0.49	—	—	0.34	—	—	2
5	0.49	—	—	0.34	—	—	2
6	0.49	—	—	0.34	—	—	2
7	0.49	—	0.39	0.34	—	—	3
8	0.49	0.44	0.39	0.34	—	—	4
9	—	0.44	0.39	0.34	—	—	3
10	0.49	—	0.39	0.34	—	—	3
11	—	0.44	—	0.34	—	—	2
12	0.49	0.44	—	0.34	—	—	3
13	0.49	0.44	—	0.34	—	—	3
14	0.49	—	—	0.34	—	—	2
15	0.49	—	—	0.34	—	—	2

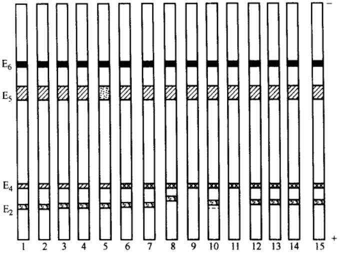


图 3-60　天麻不同变异类型酯酶同工酶电泳图谱

1，2，12—红秆天麻；3，10—绿秆天麻；4～9—乌秆天麻；

11—乌红秆天麻；13—淡红秆天麻；14—蓝秆天麻；15—淡绿秆天麻

表 3-26　不同样品的酯酶同工酶带迁移率及其酶带数

样品号	E_1	E_2	E_3	E_4	E_5	E_6	总酶带数
1	—	0.85	—	0.76	0.39	0.25	4
2	—	0.85	—	0.76	0.39	0.25	4
3	—	0.85	—	0.76	0.39	0.25	4
4	—	0.85	—	0.76	0.39	0.25	4
5	—	0.85	—	0.76	0.39	0.25	4
6	—	0.85	—	0.76	0.39	0.25	4
7	—	0.85	—	0.76	0.39	0.25	4

续表

样品号	E_1	E_2	E_3	E_4	E_5	E_6	总酶带数
8	—	—	0.83	0.76	0.39	0.25	4
9	—	—	—	0.76	0.39	0.25	3
10	0.87	0.85	—	0.76	0.39	0.25	5
11	—	—	—	0.76	0.39	0.25	3
12	—	0.85	—	0.76	0.39	0.25	4
13	—	0.85	—	0.76	0.39	0.25	4
14	—	0.85	—	0.76	0.39	0.25	4
15	—	0.85	—	0.76	0.39	0.25	4

【附】

① 天麻白麻期不同个体的蛋白电泳图谱是不完全相同的，但是主要的6条带 E_1、E_2、E_3、E_6、E_7、E_8 是完全一样的。仅几条染色浅的带和细带如 E_4、E_5、E_{10}、E_{11} 存在差异。同一表型的植株如1～3号（红秆）、4～5（绿秆）、6～8（乌秆）、9～10（东北产，表型红秆），其蛋白电泳图谱也不相同，但不同表型的植株如5号（绿秆）和9号（东北）及6号（乌秆）和10号（东北）等却是一样的。

② 天麻种内变异不同类型的过氧化物酶同工酶谱是比较相似的。E_1 和 E_4 带普遍存在于天麻物种中；E_2 和 E_3 随机出现在不同的植株，且频率较高；E_5 和 E_6 两条带出现的频率较小，仅个别植株中存在。同一表型的植株，如1号、2号、12号三样品都为红秆天麻，但其酶谱是不同的；3号、10号都为绿秆天麻，其酶谱也不相同。不同表型的植株如7（乌秆）和10（绿秆）酶谱都是一样的，5（乌秆）和15（淡绿秆）酶谱也是一样的。

③ 天麻种内变异不同类型，其酯酶同工酶谱是很相似的，都具有 E_4、E_5、E_6 等3条酶带，E_2 带仅少数样品（8号、9号和11号）中没有，E_1 和 E_3 只有个别样品中存在（E_1 仅10号样品有，E_3 仅8号样品有）。同一表型的植株，其酶谱不一定相同，如8号和9号都为乌秆天麻，8号样品有 E_3 带，9号则没有；3号和10号都为绿秆天麻，但其酶谱也不完全相同；不同表型的植株，其酶谱有时却完全一样，如1～15号样品，其中只是5号样品的 E_5 带颜色稍浅。

16. 甘草

【来源】 本品为豆科植物甘草（*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.）的干燥根及根茎。

【同工酶电泳鉴别】

（1）材料　甘草、无腺毛甘草（*G. uralensis* var. *eglandulosa* XY Li）、光果甘草（*G. glabra* Linn.）、蜜腺甘草（*G. glabra* L. var. *glandulosa* XY Li）、胀果甘草（*G. inflata* Batalin.）、料氏甘草（*G. korshinskxyi*）、黄甘草（*G. enrycarpa* P. C. Li）、粗毛甘草（*G. aspera* Pall.）、刺果甘草（*G. pallidi-*

flora Maxim.）的种子。

（2）方法

① 酶液提取　将样品种子经适当处理后，均在温室中用水培养萌发成幼苗。取叶片，用无离子水洗净后擦干，称重，剪碎后置预冷的研钵中，每克叶片加入1.5～2.0mL 0.05mol/L Tris-HCl（pH8.8）提取，在冰浴中匀浆后，离心10min（6000r/min），上清液中加入固体蔗糖至终浓度达20%，放置冰箱备用。

② 同工酶电泳　采用聚丙烯酰胺垂直平板电泳。浓缩胶浓度为3.1%，分离胶浓度为7.5%，电极缓冲溶液为pH8.3的Tris-甘氨酸。每孔上样100μL，电流为20mA。电泳至溴酚蓝距凝胶下沿1cm处停止。

③ 同工酶染色　电泳结束后，取出胶板进行过氧化物酶和酯酶特异性底物染色，然后用水漂洗至背景清晰，拍照。

（3）结果　见图3-61、图3-62、图3-63、图3-64。

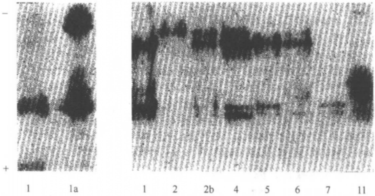


图3-61　甘草属不同品种的过氧化物酶同工酶电泳图谱

1—甘草；1a—无腺毛甘草；2—光果甘草；2b—蜜腺甘草；4—胀果甘草；5—料氏甘草；6—黄甘草；7—粗毛甘草；11—刺果甘草

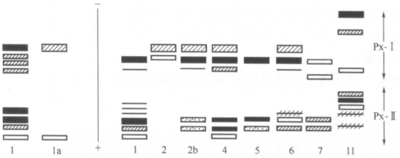


图3-62　甘草属不同品种的过氧化物酶同工酶谱带模式图

1—甘草；1a—无腺毛甘草；2—光果甘草；2b—蜜腺甘草；4—胀果甘草；5—料氏甘草；6—黄甘草；7—粗毛甘草；11—刺果甘草

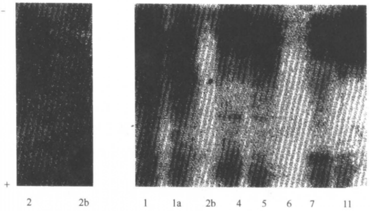


图 3-63　甘草属不同品种的酯酶同工酶电泳图谱

1—甘草；1a—无腺毛甘草；2—光果甘草；2b—蜜腺甘草；4—胀果甘草；5—料氏甘草；6—黄甘草；7—粗毛甘草；11—刺果甘草

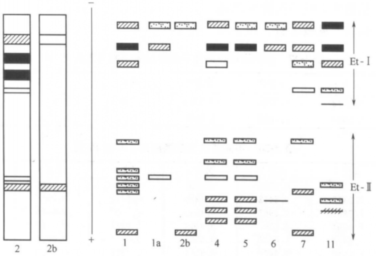


图 3-64　甘草属不同品种的酯酶同工酶谱带模式图

1—甘草；1a—无腺毛甘草；2—光果甘草；2b—蜜腺甘草；4—胀果甘草；5—料氏甘草；6—黄甘草；7—粗毛甘草；11—刺果甘草

【附】 甘草属的 7 个种和 2 个变种的过氧化物酶和酯酶同工酶，经聚丙烯酰胺凝胶电泳后，均能分离出较清晰的谱带。

17. 灵芝

【来源】 本品为多孔菌科植物赤芝［*Ganoderma lucidum*（Leyss. ex Fr.）Karst.］或紫芝（*G. sinense* Zhao，Xu et Zhang）的子实体。

【同工酶电泳鉴别】

（1）方法

① 培养基配方　麦麸 50g，葡萄糖 20g，KH_2PO_4 3g，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 15g，琼脂 17g，水 1000mL。

② 接种培养　分别用打孔法将灵芝菌种定量接入平板培养皿中，置 25℃培养箱中培养，分别培养 5 天、10 天、15 天、20 天、25 天取样。

③ 样品的制备　刮取灵芝菌丝一皿，置于研钵中加 0.1mol/LTris-HCl 缓冲溶液（pH6.7）5mL，在冰浴中研磨成浆状，离心 20min（4000r/min），上清液供电泳分析用。

④ 电泳　采用垂直平板式聚丙烯酰胺凝胶电泳。样品的分离胶浓度为 7.5%，pH8.9；浓缩胶浓度为 2.5%，pH6.7。点样量为 100μL，加 1 滴溴酚蓝为指示剂。电极缓冲溶液为 Tris-甘氨酸（pH8.3），稳定电压 250V，电泳 4h。

⑤ 染色　过氧化物同工酶采用抗坏血酸-联苯胺染色液法，37℃染色 20min。酯酶同工酶采用醋酸-萘酯和坚牢蓝染色液，37℃染色 15min，呈现出棕红色的酯酶同工酶谱带，然后用清水漂洗。

（2）结果　见表 3-27、表 3-28、表 3-29、图 3-65、图 3-66。

表 3-27　在相同培养条件下灵芝过氧化物同工酶 R_f 值

酶带号	灵芝 1	灵芝 2	灵芝 3	灵芝 4	灵芝 5	紫芝
1	0.6573	0.6786	0.6786	0.6572	0.6572	0.7425
2	0.6915	0.7096	0.7090	0.6915	0.6915	0.7923

表 3-28　不同菌株灵芝酯酶同工酶的 R_f 值

酶带号	灵芝 1	灵芝 2	灵芝 3	灵芝 4	灵芝 5	紫芝
1	0.3118	0.3118	0.3952	0.3118	0.5412	0.3600
2	0.5412	0.5412	0.4284	0.5412	0.5967	0.5600
3	0.5967	0.5967	0.4548	0.5967	0.6281	0.5967
4	0.6261	0.6261	0.5412	0.6281	0.6515	0.6515
5	0.6971	0.6591	0.5967	0.6971	0.6971	0.6971
6	0.7947	0.6977	0.6591	0.7947	0.7947	0.7947
7	0.9214	0.7553	0.6971	0.9214	0.9214	0.8365
8		0.8048	0.7553			0.9214
9		0.9062	0.8048			
10		0.9506	0.9062			
11			0.9506			

表 3-29　灵芝 2 酶带号不同培养时间的 R_f 值

酶带号	培养时间/天			
	5	10	15	20
1	0.4034	0.3118	0.5203	0.6286
2	0.6064	0.5412	0.5490	0.7071
3	0.6944	0.5967	0.6352	0.8371

续表

酶带号	培养时间/天			
	5	10	15	20
4	0.7298	0.6261	0.6627	0.8900
5	0.7812	0.6591	0.7249	0.9271
6	0.8227	0.6971	0.8691	
7	0.8484	0.7553	0.8493	
8		0.8048	0.8876	
9		0.9062		
10		0.9506		

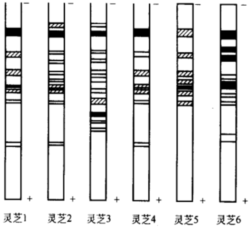


图 3-65　不同菌株灵芝酯酶同工酶酶谱图（时间 10 天）

■深棕红色；▨棕红色；□浅棕红色

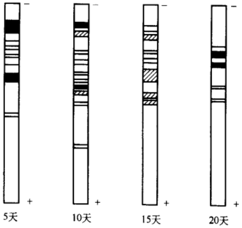


图 3-66　不同培养时间灵芝 2 的酯酶同工酶酶谱

■深棕红色；▨棕红色；□浅棕红色

【附】

① 不同灵芝菌株及紫芝过氧化物同工酶和酯酶同工酶酶谱的差异主要表现在酶带数和 R_f 值上。

② 供测的不同灵芝菌株及紫芝在完全相同培养条件下，培养 5 天，其过氧化物同工酶带较稳定，均有 2 条。其中灵芝 1、灵芝 2、灵芝 3、灵芝 4、灵芝 5 过氧化物同工酶酶谱相近，其 R_f 值也相似。但紫芝与其他 5 个菌株的过氧化物同工酶酶谱不同，其 R_f 值也有较大差异。

③ 在相同培养条件下，供测样品的酯酶同工酶在培养 10 天时，其酶谱相对稳定。灵芝 1 与灵芝 4 有极相似的酶谱，酶带数相同，其 R_f 值相近，灵芝 5 也有 7 条酶带，但 R_f 值不同，紫芝与其他样品酯酶同工酶酶谱截然不同，R_f 值差异也较大。

④ 不同培养时间同一菌株同工酶酶谱变化：随着培养时间的延长酶带数减少。所有供测菌种的过氧化物同工酶酶带数从开始培养至 20 天时，随培养时间增加，酶带数减少或消失。但培养 25 天时，观察发现又产生两条新酶带。酯酶同工酶的变化，开始随培养时间增加酶带增加，达到顶峰后，随培养时间的增加，酶带数减少。如灵芝 2，培养 5 天有 7 条酶带；培养 10 天增至 10 条；15 天为 8 条；20 天减至 5 条。紫芝培养 5 天有 6 条酶带；培养 10 天增到 8 条；15 天为 5 条；20 天减至 2 条。

18. 地龙

【来源】 本品为钜蚓科动物栉盲环毛蚓（*Pheretima pectinifera* Michaelsen）、通俗环毛蚓（*Pheretima vulgaris* Chen）、威廉环毛蚓（*Pheretima guillelmi* Michaelsen）的全体。

【纤溶酶（EFE）同工酶电泳鉴别】

（1）材料　赤子爱胜蚓（*Eisenia foetide*）全体，牛血纤维蛋白原（86mg/支），尿激酶（640U/支，中国药品生物制品检定所），凝血酶（牛血，100U/支，天津生化制品厂）。

（2）方法

① 样品的处理　将 4 种不同种类的蚯蚓分别称重，剪碎，研磨，抽提，离心后定容至 20mL，作为样品 A。

② 蚯蚓纤溶酶的酶活测定　按 Deoging 方法制备纤维蛋白平板。在纤维蛋白平板上打孔（直径 3.5mm），将 10μL 样品（含蛋白质 1μg）点入孔内，37℃恒温 18h，测透明溶圈的直径。以尿激酶（50U/mL、40U/mL、30U/mL、20U/mL、10U/mL）作标准曲线（双对数坐标图），计算 1mg 样品相当于尿激酶的单位数。

③ 样品的还原处理　取定量的 A 组样品分别加入巯基乙醇，37℃恒温水浴

2h，此为B组样品。

④ 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE） 浓缩胶浓度为3%，分离胶浓度12%，平行点样A组样品、B组样品。

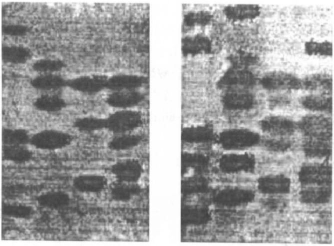
⑤ 活性印迹试验 同上制备纤维蛋白板两块。样品经PAGE后切下两组凝胶条，分别印迹在这两块纤维蛋白平板上，置37℃温浴40min后，用0.1%考马斯亮蓝染色10min，脱色过夜。

（3）结果 见表3-30、图3-67。

表3-30 4种蚯蚓的EFE活力比较

种　　类	质量/g	活力/IU·mL^{-1}	总活力/IU	比活/IU·g^{-1}
E. foetide	1	29.25	585	585
P. pectinifera Michaelsen	1.53	98.03	1960	1281
P. vulgaris Chen	2.2	103.06	2073	942.4
P. guillelmi Michaelsen	2	189.9	3738.6	1869.3

注：$n=3$。



1　2　3　4　　　1′　2′　3′　4′

(a) 同工酶谱带　　(b) 经还原后谱带

图3-67 蚯蚓同工酶活性的电泳印迹图

1，1′—*E. foetide*；2，2′—*P. pectinifera* Michaelsen；3，3′—*P. vulgaris* Chen；4，4′—*P. guillelmi* Michaelsen

【附】 威廉环毛蚓的比活（即每克蚯蚓含有的活力单位）相对于其他更高，因此，作为蚯蚓纤溶酶的原料，药典规定入药的威廉环毛蚓更为理想。

赤子爱胜蚓、栉盲环毛蚓、通俗环毛蚓、威廉环毛蚓这4种蚯蚓体内的蚯蚓纤溶酶同工酶分别为5、5、3、6种，经过巯基乙醇还原后，同工酶的二硫键被

破坏，含 2 个或多个亚基的同工酶会裂解为 2 种或多种酶片段，在印迹图谱上显示为增加几条谱带。

19. 砂仁

〖来源〗 本品为姜科植物阳春砂（*Amomum villosum* Lour.）、绿壳砂（*Amomum villosum* Lour. var. *xanthioides* T. L. Wu et Senjen）的种子。

〖过氧化物酶和酯酶的同工酶电泳鉴别〗

（1）材料 绿壳砂仁（1 号种）、丰收型阳春砂仁（2 号种）和阳春砂仁（3 号种）等的 3 年生植株顶端鲜叶。

（2）方法

① 样品制备 取以上不同品种砂仁 3 年龄植株顶叶鲜重 1g，放在研钵中，加入 pH8.3 的 Tris-甘氨酸缓冲溶液 6mL，磨成匀浆，冷冻离心 15min（8000r/min），取上清液进行电泳。

② 电泳 采用聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳法，分离胶的浓度 7%，浓缩胶浓度 2.5%，点样量 50μL，电压 300V，冰箱低温电泳分离 3h。

③ 显色 过氧化物酶用改良的醋酸苯胺法进行显带（200mg 联苯胺加 6mL 醋酸溶解后，加水至 150mL，并加维生素 C100mg，30% H_2O_2 0.5mL 为显色液）。酯酶以 3mL 1%醋酸-α-萘酯丙酮液，3mL 2%醋酸-β-萘酯丙酮液，逐滴加入溶有 200mg 坚牢蓝 RR 盐的 0.2mol/L pH6 磷酸缓冲溶液中，滤过，作为显色液。

电泳后凝胶先在 pH6 磷酸缓冲溶液中 37℃下保温 30min，倾去缓冲溶液，再加入上述染色液在 37℃下保温 30～60min，直至显色，用蒸馏水冲洗退去底色，保存于 7%醋酸溶液中。

（3）结果 见图 3-68、图 3-69。

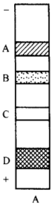


图 3-68 砂仁的酯酶同工酶谱

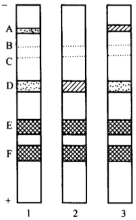


图 3-69 砂仁的过氧化物酶同工酶谱

1—绿壳砂仁；2—丰收型阳春砂仁；3—阳春砂仁

【附】 砂仁不同品种酯酶同工酶的酶带共有 4 条，酶谱显色无差异；过氧化物酶的酶谱有 6 条，而酶谱显色有差异。

20. 知母

【来源】 本品为百合科植物知母（*Anemarrhena asphodeloides* Bge.）的干燥根茎。

【同工酶的电泳鉴别】

（1）材料 移栽后的各地知母新生根茎。

（2）方法

① 样品液制备 取移栽后的各地知母新生根茎最前端的 1.0cm 段，鲜重 0.4g。于低温冰箱中固定 1h，加电极缓冲溶液（含 20%蔗糖）4.0mL。在冰浴中研磨成匀浆状，－10℃条件下离心 25min（8000r/min），取上清液 24h 内使用。

② 试剂配制（所用水为去离子水）

a. A 液 1mol/L HCl48mL，四甲基乙二胺 0.24mL，加水至 100mL。

b. C 液 丙烯酰胺 30g，亚甲基双丙烯酰胺 0.8g，加水溶解至 100mL。

c. G 液 过硫酸铵 0.14g，加水溶解至 100mL（新配），用时稀释 10 倍。

③ 电泳 采用垂直板电泳法。连续凝胶系统，按文献法配制凝胶液，A 液：C 液：G 液：水为 1：2：4：1（体积比），制备凝胶；每样品槽加入样品液 60μL，在上槽电极液中加入溴酚蓝指示剂数滴，保持电压 300V，电流 35mA，当指示染料迁移至下端时，停止电泳，剥胶，采用抗坏血酸-联苯胺染色液染色，显示过氧化物同工酶谱带，最后谱带呈褐色。

（3）结果 见图 3-70。

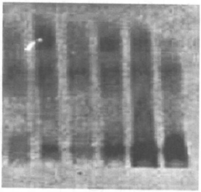


图 3-70 知母的过氧化物同工酶图谱

A—山东平度；B—天津蓟县；C—内蒙古赤峰；D—山西稷山；E—甘肃西峰；F—陕西吴旗

【附】 知母过氧化物同工酶谱带迁移率分别为 0.552～0.495、0.352～0.286、0.248、0.114～0.095。知母的过氧化物同工酶谱在种内存在明显变异，可分为 3 种类型：天津蓟县产知母具 a、b、c 三段谱带区，其中 c 段火箭形，是其特有谱带类型；内蒙古赤峰、山西稷山、甘肃西峰、陕西吴旗 4 产地知母具 a、b 两段谱区，且明显；山东平度知母仅 b 段谱区明显，a 段显色极其微弱，几乎不可见。

21. 猪苓

【来源】 本品为多孔菌科真菌猪苓［*Polyporu umbellatuse*（Pers.）Fries.］的干燥菌核。

（1）材料　猪苓菌株 Z_1、Z_2、Z_4，猪苓菌核 Z_3。

（2）方法

① 培养基　菌丝培养使用麦麸-葡萄糖培养基：麦麸 50g，葡萄糖 20g，KH_2PO_4 1.5g，$MgSO_4$ 1.0g，琼脂 15g，水 1000mL。

② 样品的制备　用 pH8.3 的 Tris-甘氨酸电极缓冲溶液制备菌丝体匀浆。刮取在 25℃条件下培养的猪苓菌丝各一皿，菌核取内部组织，然后加入 Tris-甘氨酸电极缓冲溶液（pH8.3），置－10℃冰箱冷冻，在冰浴中用研钵研磨成浆，在 4℃条件下离心 30min（3000r/min），取其上清液置冰箱内保存备用。

③ 电泳　采用聚丙烯酰胺圆盘电泳。样品分离胶浓度 7.5%，pH8.9；样品浓缩胶浓度 4.0%，pH6.7。点样 100μL；电极缓冲溶液为 Tris-甘氨酸系统，pH8.3。每管电流 2mA，加 1 滴 0.2%的溴酚蓝作为指示剂，待溴酚蓝泳动到凝胶管下端 1cm 时，停止电泳。

过氧化物酶同工酶染色采用抗坏血酸-联苯胺染色系统；酯酶同工酶染色采用醋酸-α-萘酯和坚牢蓝染色系统。将剥离的凝胶放入 pH4.7 的醋酸液中，5min 后去掉醋酸液，用蒸馏水将凝胶冲净，放入上述混合好的染色液中，37℃条件下染色 20min。酶带清晰后去掉染色液，用水冲洗干净，然后用 7%的醋酸固定。

（3）结果　见图 3-71、图 3-72、图 3-73、表 3-31、图 3-74、图 3-75。

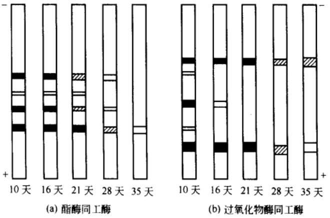
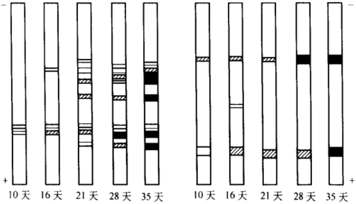


图 3-71　Z_4 菌株不同培养时间的同工酶酶谱

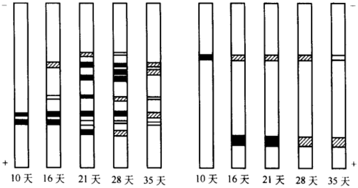
■ 强带；▨ 较强带；□ 弱带



(a) 酯酶同工酶　　(b) 过氧化物酶同工酶

图 3-72　Z_2 菌株不同培养时间的同工酶酶谱

■ 强带；▨ 较强带；□ 弱带



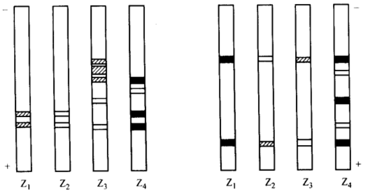
(a) 酯酶同工酶　　(b) 过氧化物酶同工酶

图 3-73　Z_1 菌株不同培养时间的同工酶酶谱

■ 强带；▨ 较强带；□ 弱带

表 3-31　不同猪苓菌株酯酶同工酶谱带 R_f 值的比较

谱带	Z_1	Z_2	Z_3	Z_4
1	0.34	0.34	0.34	
2	0.38	0.38	0.38	
3	0.41	0.41	0.41	
4	0.45	0.45	0.45	0.45
5	0.57	0.52	0.57	0.52
6	0.68	0.68		0.68
7	0.72	0.72	0.72	0.72
8	0.78	0.78		
合计	8	8	6	4

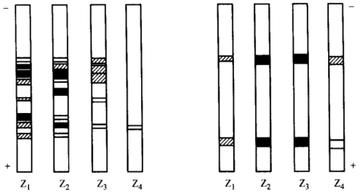


(a) 酯酶同工酶

(b) 过氧化物酶同工酶

图 3-74　培养 10 天不同菌株的同工酶酶谱图

强带；较强带；弱带



(a) 酯酶同工酶

(b) 过氧化物酶同工酶

图 3-75　培养 28 天的不同菌株的同工酶酶谱图

强带；较强带；弱带

【附】

① 同一菌株在不同培养时间内同工酶酶谱变化规律　对培养 10 天、16 天、21 天、28 天、35 天的猪苓菌株及猪苓菌核进行酯酶同工酶及过氧化物酶同工酶酶谱分析，结果表明：谱带多少及其活性与菌丝的生长速率即代谢的强弱成正比。

② 不同菌株间的同工酶图谱分析　培养 10 天、28 天的 Z_1、Z_2、Z_4 菌株及菌核 Z_3 酯酶同工酶谱及过氧化物酶同工酶谱，结果可见各菌株与猪苓菌核之间均具有特征性谱带。Z_1、Z_2、Z_3 酯酶同工酶谱带总条数分别为 8 条、8 条、6 条。Z_1 号菌株有 7 条谱带其 R_f 值与 Z_2 菌株完全一致，有 6 条谱带 R_f 值与 Z_3（猪苓菌核）完全一致。Z_2 菌株比 Z_3 菌核多出两条 R_f 值为 0.68、0.78 的谱带；

另外两菌株的第 5 条谱带 R_f 值不同，Z_2 菌株为 0.52，Z_3 菌核为 0.57（表 3-31），此外两菌株之间 5 条谱带 R_f 值完全相同。Z_1、Z_2 菌株与 Z_3 猪苓菌核过氧化物酶同工酶图谱，在培养的第 10 天、第 28 天均为 2 条谱带，R_f 值完全相同；在培养的第 10 天，Z_4 菌株除特征谱带外，过氧化物酶同工酶图谱多出 3 条谱带，酯酶同工酶图谱有 4 条谱带。

三、含多肽类中药的鉴定

1. 乌梅

【来源】 本品为蔷薇科植物梅［*Prunus mume*（Sieb.）Sieb. et Zucc.］的干燥未成熟果实。

【蛋白多肽电泳鉴别】

（1）材料　乌梅、李子（*P. salicina* Lindl.）的干燥未成熟果实。

（2）仪器　美国 BIO-RAD 公司 Bio Focus^{TM}3000 型高效毛细管电泳仪。

（3）试剂

① Tris-甘氨酸蛋白提取液（中性提取液）　Tris 0.6g，甘氨酸 2.9g，加蒸馏水溶解至 1000mL。

② 碱性蛋白提取液（碱性提取液）　Tris-HCl 0.1mol/L，抗坏血酸 56.8mmol/L，巯基乙醇 10mmol/L，pH8.0。

③ 酸性蛋白提取液（酸性提取液）　柠檬酸 80mmol/L，Na_2HPO_4 32mmol/L，抗坏血酸 5mmol/L，巯基乙醇 10mmol/L，pH2.8。

（4）方法

① 样品溶液的配制　取样品 0.5g，加入蛋白提取液 5mL，在冰浴中研磨成匀浆状，离心 20min（5000r/min），取上清液备用。

② 电泳条件　电解缓冲溶液为 30mmol/L 硼酸盐溶液（pH8.5），电压为 20kV，温度 20℃，紫外检测波长 200nm，重力进样，时间 5s。开机后先用 0.1mmol/L 氢氧化钠冲洗毛细管 2min，再用去离子水冲洗 5min，然后用缓冲液冲洗至基线平稳后开始进样。每两次进样之间设定缓冲溶液冲洗 2min。

（5）结果

① 在酸性提取液中，乌梅主要在 5.60min、8.61min 和 10.05min 处各有一吸收峰，其中 8.61min 和 10.05min 峰为强吸收峰；而李子在 5.10min、7.49min、8.02min、8.35min 和 8.66min 处各有一吸收峰，其中 8.35min 和 8.66min 峰为强吸收峰。

② 在中性提取液中，乌梅在 5.18min、8.68min 和 9.67min 处各有一吸收峰，其中 8.68min 和 9.67min 峰为强吸收峰；而李子在 4.17min、5.19min、5.29min、6.07min、6.88min、7.34min 和 9.90min 处各有一吸收峰，其中

5.19min 和 6.88min 峰为强吸收峰。

③ 在碱性提取液中，乌梅在 5.29min、7.39min、8.96min 和 9.11min 处各有一吸收峰，其中 5.29min、7.39min 和 9.11min 峰为强吸收峰；而李子在 4.73min、6.84min、7.60min、7.91min 和 8.06min 处各有一吸收峰，其中 7.91min 峰为强吸收峰。

2. 枸杞子

【来源】 本品为茄科植物宁夏枸杞（*Lycium barbarum* L.）的干燥成熟果实。

【蛋白多肽电泳鉴别】

（1）材料 宁夏枸杞（宁夏农科院芦花台园林试验场）和枸杞（福建南安）的果实。

（2）仪器 美国 BIO-RAD 公司 BioFocus^{TM}3000 型 Capillary Ion Analyzer，配有紫外扫描检测器；熔融石英毛细管 75μm×60cm（河北永年光纤厂）。

（3）试剂

① Tris-甘氨酸蛋白提取液（中性提取液） Tris 0.6g，甘氨酸 2.88g，加蒸馏水溶解至 1000mL。

② 碱性蛋白提取液（碱性提取液） Tris-HCl 0.1mol/L，0.1%抗坏血酸，巯基乙醇 10mmol/L，pH8.0。

③ 酸性蛋白提取液（酸性提取液） 柠檬酸 80mmol/L，Na_2HPO_4 32mmol/L，抗坏血酸 5mmol/L，巯基乙醇 10mmol/L，pH2.8。

（4）方法

① 样品溶液的配制 用 3 种蛋白提取液，分别配制样品溶液。取样品 0.5g，加入蛋白提取液 5mL，在冰浴中研磨成匀浆状，离心 20min（5000r/min），取上清液备用。

② 电泳条件 电解缓冲溶液为 150mmol/L 硼酸盐溶液（pH8.5）；电压为 20kV；温度 20℃；紫外检测波长 200nm；重力进样，时间 5s。开机后先用 0.1mol/L 氢氧化钠冲洗毛细管 2min，再用去离子水冲洗 5min，然后用缓冲溶液冲洗至基线平稳后开始进样。每两次进样之间设定缓冲溶液冲洗 2min。

（5）结果 见表 3-32。

表 3-32 宁夏枸杞和枸杞果实蛋白多肽电泳图谱中各峰的迁移时间 单位：min

名称	酸性蛋白多肽	中性蛋白多肽	碱性蛋白多肽
宁夏枸杞	4.0～12.0min(特征峰)	4.0～12.0min(特征峰) 16.0min(双重峰)	4.0～12.0min(特征峰) 17.8min(单峰)
枸杞	4.0～12.0min(特征峰) 19.2min(双峰)	4.0～12.0min(特征峰)	4.0～12.0min(特征峰)

【附】 HPCE对宁夏枸杞和枸杞的果实蛋白多肽检测结果表明：两者在4.0～12.0min区间具有相同的主要特征吸收峰。同时，两者在3种提取液中又有各自的特征吸收峰。

3. 三七

【来源】 本品为五加科植物三七［*Panax notoginseng*（Burk.）F. H. Chen］的干燥根。

【蛋白多肽电泳鉴别】

（1）材料　三七，菊叶三七（*Gynura segetum* Merr.）。

（2）仪器　美国BIO-RAD公司BioFocus^{TM}3000型Capillary Ion Analyzer，配有紫外扫描检测器；熔融石英毛细管75μm×60cm（河北永年光纤厂）。

（3）试剂

① Tris-甘氨酸蛋白提取液（中性提取液）　Tris 0.6g，甘氨酸2.88g，加蒸馏水溶解至1000mL。

② 碱性蛋白提取液（碱性提取液）　Tris-HCl 0.1mol/L，0.1%抗坏血酸，巯基乙醇10mmol/L，pH8.0。

③ 酸性蛋白提取液（酸性提取液）　柠檬酸80mmol/L，Na_2HPO_4 32mmol/L，抗坏血酸5mmol/L，巯基乙醇10mmol/L，pH2.80。

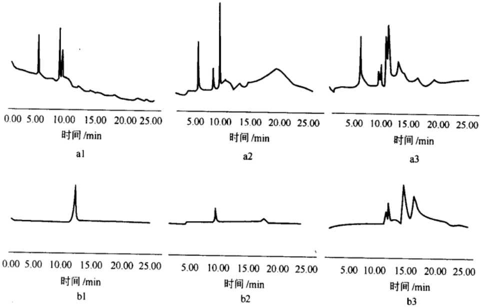


图3-76　三七和菊叶三七蛋白多肽HPCE图谱

a—三七；b—菊叶三七；1—酸性提取液；2—中性提取液；3—碱性提取液

（4）方法

① 样品溶液的配制　取样品0.5g，加入蛋白提取液5mL，在冰浴中研磨成匀浆状，离心20min（5000r/min），取上清液备用。

② 电泳条件　电解缓冲溶液为150mmol/L硼酸盐溶液（pH8.5）；电压为20kV；温度20℃；紫外检测波长200nm；重力进样，时间5s。开机后先用0.1mol/L氢氧化钠冲洗毛细管2min，再用去离子水冲洗5min，然后用缓冲溶液冲洗至基线平稳后开始进样。每两次进样之间设定缓冲溶液冲洗2min。

（5）结果　见图3-76。

〖附〗 在酸性提取液中，三七在5.21min、8.80min和9.17min处各有一吸收峰，而菊叶三七只在11.08min处有一吸收峰。在中性提取液中，三七在5.11min、7.72min和8.68min处各有一吸收峰，而菊叶三七只在9.00min处有一吸收峰。在碱性提取液中，三七在5.53min、8.75min、8.97min、9.96min、10.33min和11.99min处各有一吸收峰，而菊叶三七在10.41min、10.74min、13.40min和15.28min处各有一吸收峰。

4. 穿山甲

【来源】 本品为鲮鲤科动物穿山甲（*Manis pentadactyla* Linnaeus）的鳞甲。

【蛋白多肽电泳鉴别】

（1）材料　穿山甲及其炮制品，分别收集于广东省药材公司和安徽亳州药材市场。

（2）仪器　美国RIO-RAD公司BioFocus™3000型Capillary Ion Analyzer，配有紫外扫描检测器；熔融石英毛细管75μm×60cm（河北永年光纤厂）。

（3）试剂

① Tris-甘氨酸蛋白提取液（中性提取液）　Tris 0.6g，甘氨酸2.88g，加蒸馏水溶解至1000mL。

② 碱性蛋白提取液（碱性提取液）　Tris-HCl 0.1mol/L，0.1%抗坏血酸，巯基乙醇10mmol/L，pH8.0。

③ 酸性蛋白提取液（酸性提取液）　柠檬酸80mmol/L，Na_2HPO_4 32mmol/L，抗坏血酸5mmol/L，巯基乙醇10mmol/L，pH2.8。

（4）方法

① 样品溶液的配制　取样品0.5g，加入蛋白提取液5mL，在冰浴中研磨成匀浆状，离心20min（5000r/min），取上清液备用。

② 电泳条件　电解缓冲溶液为30mmol/L硼酸盐溶液（pH8.5），电压为20kV，温度20℃，紫外检测波长200nm，重力进样（时间5s）。开机后先用0.1mol/L氢氧化钠冲洗毛细管2min，再用去离子水冲洗5min，然后用缓冲溶

液冲洗至基线平稳后开始进样。每两次进样之间设定缓冲溶液冲洗 2min。

（5）结果　见图 3-77、表 3-33。

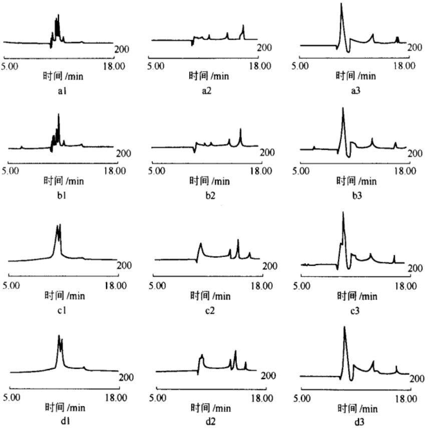


图 3-77　穿山甲及其炮制品蛋白多肽 HPCE 图谱

a—穿山甲 1；b—穿山甲 2；c—炮制品 1；d—炮制品 2；

1—酸性提取液；2—中性提取液；3—碱性提取液

表 3-33　穿山甲及其炮制品电泳图谱中各峰的迁移时间　　单位：min

名称	酸性提取液	中性提取液	碱性提取液
穿山甲	6.98，10.89，11.33，11.55，12.10，14.36	10.47，11.40，12.31，14.53，15.21，16.45	10.04，10.33，14.03，16.92
炮制品	10.33，10.65，10.91，11.10，11.26	10.48，10.79，11.35，14.30，15.30，16.60	10.01，10.26，13.61，16.35

【附】 穿山甲与其炮制品样品各自的 HPCE 图谱基本一致，但其酸性提取液的 HPCE 图谱有一定差异。在酸性提取液中，2 个穿山甲样品在 6.98min、10.89min、11.33min、11.55min、12.10min 和 14.36min 处各有一吸收峰，其中 11.33min 和 11.55min 峰为强吸收峰；而 2 个穿山甲炮制品样品在 10.33min、

10.65min、10.91min、11.10min 和 11.26min 处各有一吸收峰，其中 10.91min 和 11.26min 峰为强吸收峰。

5. 鸡内金

【来源】 本品为雉科动物家鸡（*Gallus gallus domesticus* Brisson）的干燥沙囊内壁。

【蛋白多肽电泳鉴别】

（1）材料 鸡内金，鸭内金［鸭（*Analnlatwrhvnchos donmestica* L.）的干燥沙囊内壁］。

（2）仪器 美国 BIO-RAD 公司 BioFocus™3000 型 Capillary Ion Analyzer，配有紫外扫描检测器；熔融石英毛细管 75μm×60cm（河北永年光纤厂）。

（3）试剂

① Tris-甘氨酸蛋白提取液（中性提取液） Tris 0.6g，甘氨酸 2.88g，加蒸馏水溶解至 1000mL。

② 碱性蛋白提取液（碱性提取液） Tris-HCl 0.1mol/L，0.1%抗坏血酸，巯基乙醇 10mmol/L，pH8.0。

③ 酸性蛋白提取液（酸性提取液） 柠檬酸 80mmol/L，Na_2HPO_4 32mmol/L，抗坏血酸 5mmol/L，巯基乙醇 10mmol/L，pH2.8。

（4）方法

① 样品溶液的配制 取样品 0.5g，加入蛋白提取液 5mL，在冰浴中研磨成匀浆状，离心 20min（5000r/min），取上清液备用。

② 电泳条件 电解缓冲溶液为 150mmol/L 硼酸盐溶液（pH8.5）；电压为 20kV；温度 20℃；紫外检测波长 200nm；重力进样，时间 5s。开机后先用 0.1mol/L 氢氧化钠冲洗毛细管 2min，再用去离子水冲洗 5min，然后用缓冲溶液冲洗至基线平稳后开始进样。每两次进样之间设定缓冲溶液冲洗 2min。

（5）结果 见图 3-78、表 3-34。

表 3-34 鸡内金与鸭内金电泳图谱中各峰的迁移时间 单位：min

名称	酸性提取液	中性提取液	碱性提取液
鸡内金	11.21,14.27	11.35,12.14	10.86,11.19,14.56,15.60
鸭内金	10.36,10.59,11.25,12.77,14.57,15.12,22.41	9.72,13.67,13.84,19.53	10.26,10.55,13.33,14.92,23.17

【附】

① 在酸性提取液中，鸡内金在 11.21min 和 14.27min 处各有一个吸收峰；而鸭内金在 10.36min、10.59min、11.25min、12.77min、14.57min、15.12min 和 22.41min 处各有一个吸收峰，其中 10.59min 和 12.77min 处为强吸收峰。

② 在中性提取液中，鸡内金在 11.35min 和 12.14min 处各有一个吸收峰；

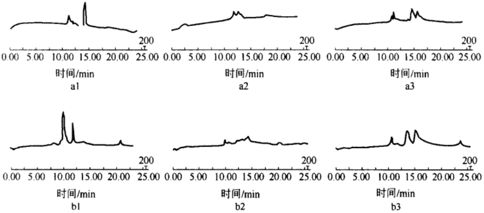


图 3-78 鸡内金与鸭内金蛋白多肽 HPEC 图谱

a—鸡内金；b—鸭内金；1—酸性提取液；2—中性提取液；3—碱性提取液

而鸭内金在 9.72min、13.67min、13.84min 和 19.53min 处各有一个吸收峰。

③ 在碱性提取液中，鸡内金在 10.86min、11.19min、14.56min 和 15.60min 处各有一个吸收峰；而鸭内金在 10.26min、10.55min、13.33min、14.92min 和 23.17min 处各有一个吸收峰。

6. 龙眼肉

【来源】 本品为无患子科植物龙眼［*Euphoria longan*（Lour.）Steud.（*Dimocarpus longan* Lour.）］的假种皮。

【蛋白多肽电泳鉴别】

（1）材料 龙眼肉，荔枝肉［无患子科植物荔枝（*Litchi chinensis* Sonn.）的假种皮］。

（2）仪器 美国 BIO-RAD 公司 BioFocus™ 3000 型 Capillary Ion Analyzer，配有紫外扫描检测器；熔融石英毛细管 75μm×60cm（河北永年光纤厂）。

（3）试剂

① Tris-甘氨酸蛋白提取液（中性提取液） Tris 0.6g，甘氨酸 2.88g，加蒸馏水溶解至 1000mL。

② 碱性蛋白提取液（碱性提取液） Tris-HCl 0.1mol/L，0.1%抗坏血酸，巯基乙醇 10mmol/L，pH8.0。

③ 酸性蛋白提取液（酸性提取液） 柠檬酸 80mmol/L，Na_2HPO_4 32mmol/L，抗坏血酸 5mmol/L，巯基乙醇 10mmol/L，pH2.8。

（4）方法

① 样品溶液的配制 取样品 0.5g，加入蛋白提取液 5mL，在冰浴中研磨成匀浆状，离心 20min（5000r/min），取上清液备用。

② 电泳条件　电解缓冲溶液为 300mmol/L 硼酸盐溶液（pH8.5）；电压为 20kV；温度 20℃；紫外检测波长 200nm；重力进样，时间 5s。开机后先用 0.1mol/L 氢氧化钠冲洗毛细管 2min，再用去离子水冲洗 5min，然后用缓冲溶液冲洗至基线平稳后开始进样。每两次进样之间设定缓冲溶液冲洗 2min。

（5）结果　见图 3-79、表 3-35。

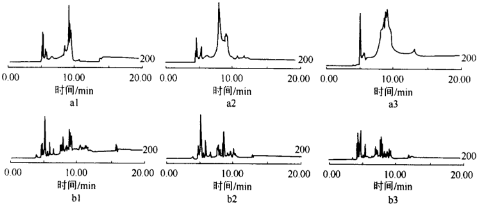


图 3-79　龙眼肉与荔枝肉蛋白多肽 HPCE 图谱

a—龙眼肉；b—荔枝肉；1—酸性提取物；2—中性提取物；3—碱性提取物

表 3-35　龙眼肉及其混淆品电泳图谱中各峰的迁移时间　　单位：min

名称	酸性提取液	中性提取液	碱性提取液
龙眼肉	5.28，5.71，8.52，9.16，9.40，9.48，14.10	5.08，5.66，5.79，7.96，8.29，8.39，8.53，9.22，9.42	5.20，5.83，7.92，8.27，8.75，8.93，9.24
荔枝肉	4.88，5.32，5.98，7.68，7.96，8.48，8.97，9.23，10.54	4.75，5.04，5.20，7.50，7.62，7.90，8.46，9.43	4.65，4.95，5.07，7.25，8.08，8.22，9.00

【附】

① 在酸性提取液中，龙眼肉在 5.28min、5.71min、8.52min、9.16min、9.40min、9.48min 和 14.10min 处各有一吸收峰，其中 5.28min 和 9.16min 峰为强吸收峰；而荔枝肉在 4.88min、5.32min、5.98min、7.68min、7.96min、8.48min、8.97min、9.23min 和 10.54min 处各有一吸收峰，其中 5.32min 和 8.97min 峰为强吸收峰。

② 在中性提取液中，龙眼肉在 5.08min、5.66min、5.79min、7.96min、8.29min、8.39min、8.53min、9.22min 和 9.42min 处各有一吸收峰，其中 8.39min 和 8.53min 峰为强吸收峰；而荔枝肉在 4.75min、5.04min、5.20min、7.50min、7.62min、7.90min、8.46min 和 9.43min 处各有一吸收峰，其中 5.20min 和 8.46min 峰为强吸收峰。

③ 在碱性提取液中，龙眼肉在 5.20min、5.83min、7.92min、8.27min、8.75min、8.93min 和 9.24min 处各有一吸收峰，其中 5.20min 峰为强吸收峰；而荔枝肉在 4.65min、4.95min、5.07min、7.25min、8.08min、8.22min 和 9.00min 处各有一吸收峰，其中 4.65min、5.07min 和 8.08min 峰为强吸收峰。

7. 云芝

【来源】 本品为多孔菌科植物中国云芝［*Coriolus rersicolor*（Fr.）Quel.］的干燥子实体。

【云芝糖肽电泳鉴别】

（1）材料　云芝糖肽 P1、P2、P3（上海新康制药有限公司提供，批号分别为 98501、98502、98503），云芝糖肽（PSP）。

（2）仪器　G1600AX 高效毛细管电泳仪（美国），配有二极管阵列检测器；熔融石英毛细管 75μm×50cm。

（3）方法

① 电泳 A　背景电解质为 20mmol/L 硼酸盐缓冲溶液（pH9.3），样品用气压 50mPa 进样 4s，分离电压 30kV，DAD 检测全波长扫描。

② 电泳 B　背景电解质为 50mmol/LpH2.5 磷酸缓冲溶液，样品用气压 50mPa 进样 4s；分离电压 30kV，DAD 检测全波长扫描。

（4）结果　不同电泳条件下特征谱（P3 样品）见图 3-80、表 3-36、图 3-81、表 3-37；不同批号云芝糖肽的特征谱见图 3-82、表 3-38。

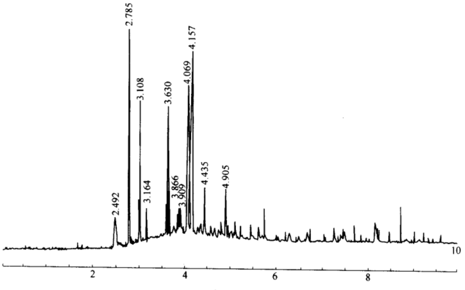


图 3-80　PSP 的 HPCE 图谱（A 条件）

表 3-36 PSP 的 HPCE 特征谱（A 条件）

峰序号	峰迁移时间/min	峰面积/mAU・s	峰高/mAU	纯度因子	λ_{max}/nm
1	2.492	20.9	3.8	13.027	198
2	2.785	18.2	22.6	318.589	192
3	3.018	21.5	15.4	238.762	198,258
4	3.154	11.3	5.7	435.927	196,256
5	3.63	50.9	15	92.669	194,252
6	3.866	16.3	6	206.739	192,210,268
7	3.909	15.4	4.8	347.598	198
8	4.069	47	17.2	16.872	190,256
9	4.157	39.8	20.6	749.358	200,210
10	4.435	21.9	7	408.908	200,254
11	4.905	13.5	6.7	427.286	200,256

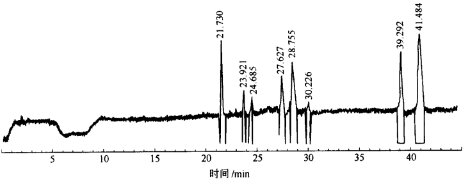


图 3-81 PSP 的 HPCE 图谱（B 条件）

表 3-37 PSP 的 HPCE 特征谱（B 条件）

峰序号	峰迁移时间/min	峰面积/mAU * s	峰高/mAU	纯度因子	λ_{max}/nm
A	21.730	130.5	7.58	381.1	212,280
B	23.921	63.8	3.84	283.0	204,254
C	24.685	46.7	3.21	206.5	190
D	27.627	116.5	4.84	442.5	196,254
E	28.775	151.0	5.84	452.6	196,254
F	30.226	75.0	2.89	248.7	200,254
G	39.292	175.6	6.50	36.9	212,280
H	41.184	268.3	7.93	32.7	210,254

表 3-38 不同样品特征谱的比较

峰序号	样品	迁移时间/min	峰高/mAU	峰面积/mAU * s	纯度因子
b	P1	2.786	6.8	4.2	318.3
	P2	2.787	12.6	10.4	416.4
	P3	2.785	18.2	22.6	318.6
c	P1	3.014	7.4	2.7	319.6
	P2	3.026	16.8	11.6	505.4
	PP	3.018	21.5	15.4	238.8
d	P1	3.164	6.4	4.4	280.9
	P2	3.164	7.4	5.2	311.9
	P3	3.154	11.3	5.7	435.9
x	P1	3.756	23.3	13.3	5.6

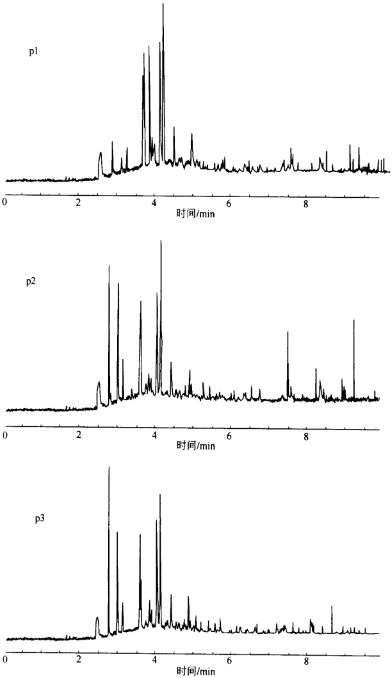


图 3-82　不同批号样品的 HPCE 图谱

8. 紫苏子

【来源】 本品为唇形科植物紫苏［*Perilla frutescens*（L.）Britt.］的成熟果实。

【蛋白多肽电泳鉴别】

（1）材料 紫苏子，荠苧子｛唇形科植物石荠苧［*Mosla scabra*（Thunb.）C. Y. Wu. et H. W. Li］的干燥成熟果实｝。

（2）仪器 G1600AX 高效毛细管电泳仪（美国惠普公司），配有二极管阵列检测器；熔融石英毛细管 75μm×50cm。

（3）试剂

① Tris-甘氨酸蛋白提取液（中性提取液） Tris0.6g，甘氨酸 2.88g，加蒸馏水溶解至 1000mL。

② 碱性蛋白提取液（碱性提取液） Tris-HCl 0.1mol/L，0.1%抗坏血酸，巯基乙醇 10mmol/L，pH8.0。

③ 酸性蛋白提取液（酸性提取液） 柠檬酸 80mmol/L，Na_2HPO_4 32mmol/L，抗坏血酸 5mmol/L，巯基乙醇 10mmol/L，pH2.8。

（4）方法

① 样品溶液的配制 取样品 0.5g，加入蛋白提取液 5mL，在冰浴中研磨成匀浆状，离心 20min（5000r/min），取上清液备用。

② 电泳条件 电解缓冲溶液为 30mmol/L 硼酸盐溶液（pH8.5）；电压为 20kV；温度 20℃；紫外检测波长 200nm；重力进样，时间 5s。开机后先用 0.1mol/L 氢氧化钠冲洗毛细管 2min，再用去离子水冲洗 5min，然后用缓冲溶液冲洗至基线平稳后开始进样。每两次进样之间设定缓冲溶液冲洗 2min。

（5）结果 见表 3-39。

表 3-39 紫苏子等电泳图谱中各峰迁移时间 单位：min

名称	酸性提取液	中性提取液	碱性提取液
紫苏子	7.26，11.44，11.89，12.16，12.64，12.81，12.89，15.43	6.99，10.73，11.59，11.82，12.34，12.55，12.67，13.04，14.76，17.19	7.20，10.73，10.97，11.05，11.50，11.95，12.55，12.85，13.06，13.62，15.02，15.51
荠苧子	10.95，11.44，11.59，12.02，14.22，17.89	10.91，12.31，15.27，16.87	12.11，12.53，12.66，14.50

【附】

① 在酸性提取液中，2 个紫苏子样品在 7.26min、11.44min、11.89min、12.16min、12.64min、12.81min、12.89min 和 15.43min 处各有一吸收峰，其中 12.16min 峰为强吸收峰；而荠苧子在 10.95min、11.44min、11.59min、12.02min、14.22min 和 17.89min 处各有一吸收峰，其中 11.44min 峰为强吸收峰。

② 在中性提取液中，2 个紫苏子样品在 6.99min、10.73min、11.59min、11.82min、12.34min、12.55min、12.67min、13.04min、14.76min 和 17.19min 处各有一吸收峰，其中 17.19min 峰为强吸收峰；而荠苎子在 10.91min、12.31min、15.27min 和 16.87min 处各有一吸收峰，其中 15.27min 峰为强吸收峰。

③ 在碱性提取液中，2 个紫苏子样品在 7.20min、10.73min、10.97min、11.05min、11.50min、11.95min、12.55min、12.85min、13.06min、13.62min、15.02min 和 15.51min 处各有一吸收峰，其中 11.95min 峰为强吸收峰；而荠苎子在 12.11min、12.53min、12.66min 和 14.50min 处各有一吸收峰，其中 12.66min 峰为强吸收峰。

9. 狗脊

【来源】 本品为蚌壳蕨科植物金毛狗脊［*Cibotium barometz*（L.）J. Sm.］的干燥根茎。

【蛋白多肽电泳鉴别】

（1）材料 狗脊及其炮制品，黑狗脊（来源不详）。

（2）仪器 G1600AX 高效毛细管电泳仪（美国惠普公司），配有二极管阵列检测器；熔融石英毛细管 75μm×50cm。

（3）试剂

① Tris-甘氨酸蛋白提取液（中性提取液） Tris0.6g，甘氨酸 2.88g，加蒸馏水溶解至 1000mL。

② 碱性蛋白提取液（碱性提取液） Tris-HCl 0.1mol/L，0.1%抗坏血酸，巯基乙醇 10mmol/L，pH8.0。

③ 酸性蛋白提取液（酸性提取液） 柠檬酸 80mmol/L，Na_2HPO_4 32mmol/L，抗坏血酸 5mmol/L，巯基乙醇 10mmol/L，pH2.8。

（4）方法

① 样品溶液的配制 取样品 0.5g，加入蛋白提取液 5mL，在冰浴中研磨成匀浆状，离心 20min（5000r/min），取上清液备用。

② 电泳条件 电解缓冲溶液为 30mmol/L 硼酸盐溶液（pH8.5）；电压为 20kV；温度 20℃；紫外检测波长 200nm；重力进样，时间 5s。开机后先用 0.1mol/L 氢氧化钠冲洗毛细管 2min，再用去离子水冲洗 5min，然后用缓冲溶液冲洗至基线平稳后开始进样。每两次进样之间设定缓冲溶液冲洗 2min。

（5）结果 见图 3-83，表 3-40。

【附】 在3 种提取液中，黑狗脊在 6.5～7min 区间有一特征吸收峰。在碱性提取液中，狗脊在 17～20min 区间有多重指纹图谱峰。在中性提取液中，黑狗脊在 6.5～7min 区间的特征吸收峰明显。在酸性提取液中，黑狗脊除在 6.5～

7min 区间的特征吸收峰外，其最大吸收峰有一肩峰。

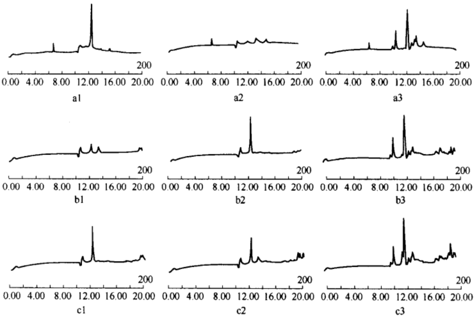


图 3-83 狗脊等蛋白多肽电泳图谱

a—黑狗脊；b—狗脊；c—炮制狗脊；

1—酸性提取物；2—中性提取物；3—碱性提取物

表 3-40 狗脊等蛋白多肽电泳图谱中各峰迁移时间 时间：min

名称	酸性蛋白多肽	中性蛋白多肽	碱性蛋白多肽
黑狗脊	6.77，10.59，12.37，12.50，15.13	6.83，10.58，12.22，13.47，13.77，15.10	6.85，10.33，10.81，12.47，13.17，13.59，13.84，14.98
狗脊（未炮制）	10.79，12.38，13.16，19.52	10.52sh，10.68，12.27，13.30，19.07	10.25，10.71，12.36，13.01，13.40，13.61，17.75，19.41，19.84
狗脊（炮制）	10.65，12.18，19.35	10.34，12.05，13.07，19.05，19.03，19.85	10.10，10.57，11.87sh，12.12，12.83，13.27，13.43，19.15

10. 榧子

【来源】 本品为红豆杉科植物榧（*Torreya grandis* Fort.）的干燥成熟种子。

【蛋白多肽电泳鉴别】

（1）材料　见表 3-41。

（2）仪器　FD-201 电泳仪，垂直电泳槽等。

（3）试剂

① 电泳缓冲溶液　250mmol/LTris、250mmol/L 甘氨酸（电泳级，pH8.3）。

表 3-41　国产榧属植物来源

样　　品	植物学名	采　集　地
榧子	榧树 *T. grandis*	浙江诸暨
九龙山榧子	九龙山榧 *T. jiulongshanensis*	浙江遂昌
香榧子	香榧 *T. grandis* cv. *merrillii*	浙江诸暨
长叶榧子	长叶榧 *T. jachii chun.*	浙江仙居
巴山榧子	巴山榧 *T. fargesii Franch*	湖北神农架
云南榧子	云南榧 *T. yunnanensis Cheng of L. K. Fu*	云南洱源
日本榧子	日本榧 *T. nucifera Sieb.* et *Zucc.*	上海

② 加样缓冲溶液　50mmol/L Tris（pH6.8）、100mmol/L DTT、2%SDS、0.1%溴酚蓝、10%甘油。

③ 30%丙烯酰胺　丙烯酰胺 29g，*N*,*N'*-亚甲基双丙烯酰胺 1g，去离子水加至 100mL。

④ 10%分离胶　5.9mL、30%丙烯酰胺 5.0mL、1.5mol/L Tris（pH6.8）3.8mL、10%SDS0.15mL、1%AP0.05mL、TEMED6μL。

⑤ 5%浓缩液　水 3.4mL，30%丙烯酰胺 0.83mL，1.0mol/L Tris（pH6.8）0.63mL，10%AP0.05mL，TEMED5μL。

⑥ 染色液　90mL 甲醇：水（体积比为 1：1）和 10mL 冰醋酸混合液中加入 0.25g 考马斯亮蓝 R_{250}。

⑦ 标准品　低分子质量标准蛋白质，由磷酸化酶 B（phosphorylase，94000D）、牛血清白蛋白（albumin，67000D）、肌动蛋白（actin，43000D）、碳酸酐酶（carbonic anhydrase，30000D）和烟草花叶病毒外壳蛋白（TMV 外壳蛋白，17500D）组成。



图 3-84　蛋白多肽凝胶电泳图谱

1—榧子；2—九龙山榧子；3—香榧子；4—日本榧子；5—长叶榧子；6—巴山榧子；7—云南榧子；8—标准蛋白质

（4）方法

① 样品溶液的制备　取上述种子约 5g，60℃烘干，粉碎。粉末加 3 倍量丙酮，浸渍 24h，残渣用丙酮洗涤两次后立即吹干，加 4 倍量 10%甘油浸渍 48h，滤过，滤液 80℃浓缩，浓缩液倾入 3 倍量乙醇中，沉淀物用乙醇洗涤，硅胶干燥器中干燥，得种仁蛋白多肽。在所提取的蛋白多肽中加入 20μL 加样缓冲溶液，95℃水浴 20min。

② 电泳　各样品液及标准对照品点样各 20μL。先 30V，40min；再 50V，

4h 以上。用染色液室温染色 4h 以上，用脱色液脱色至背景清晰为止，约 18h。照相。

（5）结果　见图 3-84、表 3-42。

表 3-42　榧属植物的种子蛋白多肽电泳谱带分子质量

种子基源	谱带分子质量/kD	种子基源	谱带分子质量/kD
榧子	70,52,30,29,24,21.5,16	巴山榧子	31,29,23,16
九龙山榧子	70,30,29,16	云南榧子	73,52,46,30.5,29,16
香榧子	32,29,16	日本榧子	83,73,64,50,34,29,25,21.5,20,16
长叶榧子	70,54,31,29,24,16	标准蛋白质	94,67,43,30,17.5

〖附〗 直接使用半对数作图纸，以横轴（十进位数）为电泳距离（自分离胶起点至条带中线距离），纵轴（对数）为分子质量值作出标准曲线，线性关系很好。测出样品各电泳谱带的距离后，然后直接从标准曲线上查出相对应的分子质量（千道尔顿，kD)。榧属植物种子蛋白多肽的特征谱带是 29kD 和 16kD 谱带。

参 考 文 献

1 鞠爱华，杨来秀，青梅等．蛤蚧及其伪品的蛋白电泳鉴别．中国中药杂志 [J]．1994，19 (1)：9～10

2 董婷霞，卢振强，詹华强．海马类药材的高效毛细管电泳鉴别．中药材 [J]．2001，24 (5)：328～329

3 李洁，宋健．合欢皮与山合欢皮的凝胶蛋白电泳鉴别．山东中医药大学学报 [J]．2003，27 (1)：70～71

4 陈吉炎，童玉玺，安志斌等．何首乌及其混伪品的凝胶电泳鉴别．中药材 [J]．1998，21 (2)：71～72

5 赵华英，许欣荣，陈永林等．羚羊角及其伪品的蛋白电泳鉴别．中国中药杂志 [J]．1994，19 (9)：524～525

6 仲昭庆，卢守奇．鹿鞭的电泳鉴别．中药材 [J]．1997，20 (7)：339～340

7 鞠爱华，青梅，高荣等．马钱子类及伪品山马钱的凝胶电泳鉴别研究．内蒙古医学院学报 [J]．1997，19 (1)：56～57

8 李峰，张振秋，韩家珩等．阿胶的凝胶电泳鉴别．时珍国医国药 [J]．1999，10 (5)：346～347

9 陈振德，许重远等．穿山甲及其炮制品蛋白多肽高效毛细管电泳法鉴定．广东药学院学报 [J]．2000，16 (4)：302～305

10 聂桂华，黄声凤，连莹等．冬虫夏草及其伪品的凝胶电泳鉴别．中药材 [J]．1997，20 (9)：457～458

11 孙闰芳．钝叶决明子、决明子、望江南子的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴别．天津药学 [J]．1996，8 (3)：69～71

12 吴谦，俞瑜，杨燕军等．Panax 属西洋参、人参及三七的蛋白电泳指纹鉴别．中药材

[J]. 1999, 22 (11): 559～562
13 刘惠娟，李萍，徐珞珊等. 二十种贝母药材的蛋白质电泳鉴别中国药科大学中药材 [J]. 1992, 25 (11): 23～25
14 张昕原，李宝山，布和巴特等. 几种蒙药材果实的凝胶电泳鉴别. 时珍国医国药 [J]. 1998, 9 (4): 351
15 杨九艳，庞秀生，鞠爱华等. 蒙药大黄及土大黄的凝胶电泳鉴别. 中国民族医药杂志 [J]. 2000, 6 (12) 增刊: 84～85
16 陈玉枝，朱恒英. 闽产砂仁与山姜的蛋白电泳鉴别. Journal of Fujian College of TCM [J]. 1997, 7 (2): 32～33
17 马晓莉，李贞洁，徐风彩. 何首乌及其混伪品的电泳鉴别. 中药材 [J]. 1997, 20 (4): 181～182
18 张波，谭峰，黄开颜. 梯度 PAGE 鉴别桃仁. 中药材 [J]. 2003, 26 (3): 176
19 李锋，张振秋，任子和等. 熊胆的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴别. 中国中药杂志 [J]. 1997, 22 (9): 524～525
20 刘惠娟，徐国钧，蔡金娜. 中药蛇床子可溶性蛋白电泳分析. 中国中药杂志 [J]. 1993, 18 (8): 465～466
21 李明. 当归及其混伪品的过氧化物同工酶电泳鉴别. 中药材 [J]. 2000, 23 (4): 200
22 徐凌川，卢燕，辛学梅等. 白首乌蛋白质及同工酶电泳实验研究. 时珍国医国药 [J]. 2003, 12
23 郭美丽，张芝玉，张汉明等. 不同栽培居群红花的孢粉特征、同工酶谱及化学成分含量. 中国药学杂志 [J]. 1999, 34 (11): 728～730
24 赵寿经，赵亚会，黄朝辉. 人参、西洋参同工酶电泳分析. 特产研究. [J]. 1996, 4: 21～25
25 宋洪涛，郭涛，张跃新等. 中药红曲中蛋白酶和淀粉酶的检测. 辽宁药物与临床. [J]. 1999, 2 (1): 14～16
26 贾江滨，陈振德，侯连兵等. 乌梅及其混淆品李子的蛋白多肽高效毛细管电泳法鉴别. 第一军医大学报. [J]. 2000, 20 (4): 24～25
27 陈志良，陈振德，侯连兵等. 枸杞子蛋白多肽的高效毛细管电泳法鉴别. 中国药学杂志 [J]. 2001, 36 (3): 192～194
28 侯连兵，陈振德，陈志良等. 三七及其混淆品蛋白多肽高效毛细管电泳法鉴别. 中草药. [J]. 2000, 31 (11): 859～860
29 陈振德，许重远，庄志铨等. 穿山甲及其炮制品蛋白多肽高效毛细管电泳法鉴定. 广东药学院学报 [J]. 2000, 16 (4): 302～305
30 陈振德，许重远，谢立. 蛋白多肽高效毛细管电泳法鉴别鸡内金与鸭内金. 中药材 [J]. 2002, 25 (14): 246～247
31 谢立，陈振德，陈志良等. 龙眼肉及其混淆品蛋白多肽高效毛细管电泳法鉴别. 中成药 [J]. 2000, 22 (6): 436～437
32 朱丽玢，洪筱冲. 云芝糖肽高效毛细管电泳分析 [J]. 中药材. 2000, 23 (4):

227～229

33 杨西晓，陈振德，许重远等. 蛋白多肽高效毛细管电泳法鉴别紫苏子及其混淆品 [J]. 中药材. 2000，23（10）：605～607

34 许重远，陈振德等. 狗脊及其混淆品蛋白多肽高效毛细管电泳法鉴别 [J]. 中药材. 1999，22（7）：336～337

35 陈振德，侯逢兵，陈志良等. 国产榧属植物种子蛋白多肽凝胶电泳鉴定 [J]. 中药材. 1999，22（8）：394～396

36 袁晓华等. 植物生理生化实验. 北京：高等教育出版社，1983.223

（张贵君，李仁伟，苏　民）

第四章　生物效价鉴定法

生物效价测定是中药生物效应鉴定的重要内容之一，它是在严格控制的试验条件下，通过比较标准品和供试品对生物体或离体器官与组织的特定（生理或病理）生物效应，从而评价中药的质量。

第一节　概　　述

一、基本理论

生物效价鉴定法，也叫生物活性鉴定法。即利用药物或其组分的效价、生物活性的强度，以鉴别中药品质的方法。

中药效价测定法是利用生物体的反应来鉴定其有效组分的存在、含量或效价，以及测定其的疗效和毒性等。该方法是以分子药理学为基础，以生物统计为工具，运用特定的实验方法和病理模型，通过比较被测物与相应的标准品在一定条件下产生特定生物反应的剂量比例，测出药物的活性作用。按所使用的实验动物的不同，常有蛙法、猫法、鼠法及鸽法等；按实验设计方法的原理，可分为直接测定法和量反应平行线测定法。

生物效价测定的主要原则是将需鉴定的药物与标准品（其中包括有效组分、饮片，纯成分和制剂）在严格规定的条件下，比较它们对生物体所产生的反应强度，再计算出其剂量标准。中药的效价通常以 1g 中药中所具有的“作用单位”数来表示。这种“作用单位”即“效价单位”，即指在一定条件下所表现一定生理作用的最小剂量。

二、应用范围

适用于结构复杂、理化方法不能测定其含量或者理化测定不能反映其临床生物活性的药物。如洋地黄及其制剂、缩宫素及其制剂、铃兰毒苷及其注射液等。对尚未明确有效组分的中药，以其疗效为基础设计生物效价鉴定方法，达到控制质量的目的，尤具有重大的现实意义。

三、量反应与质反应

（1）量反应　药物对生物体所引起的反应是可以计量大小的，如器官长度的

伸缩，血压、血糖的高低，抑菌直径的大小等。也包括时反应，即观察一种反应出现所需要的时间，如动物的生存时间、凝血时间等，属于特殊的量反应。

（2）质反应　当一定量的药物注入动物体后，观察某一反应或反应的某一程度出现与否，如死亡、惊厥等，只有质的变化，故称为质反应。此时，只用反应率，如死亡率、阳性率和惊厥率等，来表达个体的反应程度，而不能用量来表示。

在一定条件下，质反应与量反应可以相互转换。如血压的高低为量反应，若规定血压值高于一定值为高血压病人而研究一定群体中的高血压概率，这时量反应就转变为质反应了。

有些药物，特别是具有多功效作用特点的中药，可以选用不同类型的反应指标来进行生物效价的测定。在选用指标时，一般应当注意以下几点：

① 同质反应的剂量范围要宽，因为生物鉴定都是在同质反应基础上进行的，而药物同质反应都有一定的剂量范围，超出一定范围就会发生质的改变。

② 指标的重现性要好，即同剂量各次反应之间差异要小。

③ 指标的灵敏度要高，即反应程度应随剂量的变化而有显著的改变。

④ 剂量与反应之间应当服从一定的数学规律。

四、生物效价鉴定的实验设计

生物效价鉴定是从定量的角度研究量效关系的，因生物差异较大，故在实验设计和结果分析时需要借助数理统计的知识和方法。生物效价鉴定一般是根据平行线原理进行统计和分析，其中，质反应设计有概率单位法，量反应设计有完全随机法、随机分组法、交叉设计法和拉丁设计法等。

中国药典收载的量反应鉴定主要有（2.2）法、（3.3）法或（2.2.2）法、（3.3.3）法，即标准品（S）、供试品（T或U）各用2个剂量组或3个剂量组，统称为（$k \cdot k$）法或（$k \cdot k \cdot k$）法。如果S和T的剂量组数不相等，则称为（$k \cdot k'$）法。前面的k代表S的剂量组数，后面的k或k'代表T的剂量组数。一般都是按（$k \cdot k'$）法实验设计。

五、生物效价鉴定的基本原则与要求

1. 标准品与供试品

生物效价检定的结果是通过标准品和供试品的对比得到的。标准品的应用降低了由于生物差异所造成的实验误差。标准品是已知效价的，并由法定机关提供。由于中药具有特殊性，其标准品可以是有效组分的形式。标准品应具有均匀、稳定而持久的性质，并在药理性质上与供试品尽可能相近或相同，使试验检定的结果尽量与临床疗效相似。

生物效价检定标准品（S）的标示效价以效价单位（U）表示，其含义和相应的国际标准品的效价单位一致。供试品（T）或（U）是供检定其效价的样品，它的活性组分应与标准品基本相同。A_T 或 A_U 是 T 或 U 的标示量或估计效价。

2. 等反应剂量对比

生物效价检定是将 T 和其 S 在相同的实验条件下同时对生物体或其离体器官组织等的作用进行比较，通过对比，计算出它们的等反应剂量比值（R），以测得 T 的效价 P_T。

R 是 S 和 T 等反应剂量（d_S、d_T）的比值，即 $R=d_S/d_T$。

M 是 S 和 T 的对数等反应剂量（x_S、x_T）之差，即 $M=\lg d_S-\lg d_T=x_S-x_T$。

$$R=\text{anti}\ \lg M$$

P_T 是通过检定测得 T 的效价含量，称 T 的测得效价，是将效价比值（R）用 T 的标示量或估计效价 A_T 校正之后而得，即 $P_T=A_T\cdot R$ 或 $P_T=A_T\cdot \text{anti}\ \lg M$。

检定时，S 按标示效价计算剂量，T 按标示量或估计效价（A_T）计算剂量，注意调节 T 的剂量或调整其标示量或估计效价，使 S 和 T 的相应剂量组所致的反应程度相近。

3. 生物变异的控制

生物检定具有一定的实验误差，其主要来源是生物变异性。因此生物检定必须注意控制生物变异，或减少生物变异本身，或用适宜的实验设计来减小生物变异对实验结果的影响，以减小实验误差。控制生物变异必须注意以下几点：

① 生物来源、饲养或培养条件必需均一。

② 对影响实验误差的条件和因子，实验设计时应尽可能作为因级限制，将选取的因级随机分配至各组。如体重、性别、窝别、双碟和给药次序等都是因子，不同体重是体重因子的级，雌性雄性是性别因子的级，不同窝的动物是窝别因子的级，不同双碟是碟间因子的级，给药先后是次序因子的级等。按程度划分的级（如动物体重），在选级时，应选动物较多的邻近几级，不要间隔跳越选级。

③ 按实验设计类型的要求将限制的因级分组时，也必须严格遵守随机的原则。

4. 误差项

指从实验结果的总变异中分去不同剂量及不同因级对变异的影响后，剩余的变异成分，用方差（s^2）表示。对于因实验设计类型的限制无法分离的变异成分，或估计某种因级对变异的影响小，可不予分离者，都并入 s^2。但剂量间变异必须分离。

误差项的大小影响标准误 S_M 和可信限（FL）。不同的检定方法和实验设计类型，分别按有关的公式计算 s^2。

5. 可靠性测验

平行线检定要求在实验所用的剂量范围内，对数剂量的反应（或反应的函数）呈直线关系，供试品和标准品的直线应平行。可靠性测验即验证供试品和标准品的对数剂量反应关系是否显著偏离平行偏离直线，对不是显著偏离平行偏离直线（在一定的概率水平下）的实验结果，认为可靠性成立，方可按有关公式计算供试品的效价和可信限。

6. 可信限

可信限（FL）标志检定结果的精密度。M 的可信限是 M 的标准误 S_M 和 t 值的乘积（$t \cdot S_M$），用 95%的概率水平。$M+t \cdot S_M$ 是可信限的高限；$M-t \cdot S_M$ 是可信限的低限。用其反对数计算得 R 和 P_T 的可信限低限及高限，是在 95%的概率水平下从样品的检定结果估计其真实结果的所在范围。

R 或 P_T 的可信限率（FL%）是用 R 或 P_T 的可信限计算而得。

计算可信限的 t 值是根据 s^2 的自由度（f）查 t 值表而得。t 值与 f 的关系见表 4-1。

表 4-1　t 值表

f	t	f	t	f	t	f	t
3	3.18	8	2.31	14	2.15	30	2.04
4	2.78	9	2.26	16	2.12	40	2.02
5	2.57	10	2.23	18	2.10	60	2.00
6	2.45	11	2.20	20	2.09	120	1.98
7	2.37	12	2.18	25	2.06	∞	1.96

注：$P=0.95$。

各品种的检定方法项下都有其可信限率的规定，如果检定结果不符合规定，可缩小动物体重范围或年龄范围，或调整对供试品的估计效价或调节剂量，重复实验以减小可信限率。

对同批供试品重复试验所得 n 次实验结果（包括 FL%超过规定的结果），可按实验结果的合并计算法算得 P_T 的均值及其 FL%作为检定结果。

第二节　生物反应的量效关系

一、质反应的量效关系

1. 直接测定法

一般用于刚刚产生质反应的剂量可以准确测定的实验。如洋地黄效价测定

（鸽最小致死量法，MLD）。

某些发挥作用较快的药物，将药液由静脉缓慢注入动物体内，反应指标明确可靠，能准确测定刚刚产生质反应的最小剂量（MED）。如洋地黄效价测定的鸽法，即可用直接法测定得到其最小致死剂量（MED）。

直接测定法的具体方法：将实验对象分成两组，即 S 和 T，然后分别测定 S 和 T 的 MED，最后再计算出 S 和 T 各自的 $\lg MED$ 及其均值 $\bar{x}_S$ 和 $\bar{x}_T$。此外，直接测定法也可以用 S 和 T 各自的 MED 均值 d_S 和 d_T 作为 S 和 T 的等反应剂量，计算 S 和 T 的强度比值 R。两种计算方法所得结果比较接近。

直接测定法的优点是，可使用较少量的动物直接测得 S 和 T 的等反应剂量。本法常用的实验设计有两种类型，即随机设计和配对交叉设计。

2. 平行线测定法

适用于刚刚产生质反应的剂量不能准确测定的实验。当反应指标为质反应，而药物的作用又发挥较慢，故无法准确测得刚刚产生药效的剂量。如胰岛素效价测定采用的小鼠惊厥法。

此类质反应的测定方法是将动物分组，各组给予不同的剂量，根据各剂量组内出现正性质反应指标的动物数，算出该组的正性反应率，以剂量的对数为横坐标，反应百分率为纵坐标，得到一条对称的 S 形曲线。如果将反应百分率转换为概率单位，则概率单位与对数剂量之间就成直线关系。

这种质反应类型常用于对两个药物的疗效强弱或毒力高低进行对比鉴定，即将供试品 T 和标准品（对照品）S 同时对比，以测定 T 和 S 的效价（毒力）比值 R。当 S 和 T 的性质相近时，它们的对数剂量 x 和反应百分率的函数 y 的直线平行，因此，此类质反应的对比鉴定也是用平行线测定法。

此外，这种类型也用于测定药物的半数有效量或半数致死量。

中国药典 2005 版的质反应平行线测定，用的是简化概率单位法，它必须具备以下几点。

① 相邻剂量组的比值（r）要相等，一般用（1∶0.8）～（1∶0.5）。

② 各剂量组的动物数（n）要相等，或相差不超过 2 只。

③ 调节剂量，使约一半组数的反应率大于 50%，约一半组数小于 50%，且不得有 100%和 0 的反应率出现。

④ 根据各剂量组的阳性反应率查有关表得相应的概率单位（y）和权重系数（W_c）；因此，质反应平行线测定每一剂量组只有一个 y，反应个数（m）$=1$。

⑤ 可靠性测验以及 R、P_T、S_M、FL 等的计算均同量反应，按有关公式计算。但 S^2 按下式计算：

当各剂量组的动物数（n）不等时，$S^2=K/(n\sum W_c)$；K 为 S 和 T 的剂量组和；

当各剂量组的动物数（n）相等时，$S^2=K/(\sum nW_c)$。

⑥ 质反应平行线测定的 t 为 1.96（$P=0.95$）。

二、量反应的量效关系

① 对数剂量与反应本身成直线关系（这种关系最常见）。

② 对数剂量与对数反应成直线关系（这种关系多见于时反应，如体外试验肝素的抗凝血作用时肝素的浓度对数与凝血时间的对数成直线关系）。

③ 对数剂量与反应的平方根成直线关系（这种关系较少见）。

④ 对数剂量与反应的倒数成直线关系（这种关系多见于时反应，如动物感染病毒后生存的倒数与病毒接种量的对数成直线关系）。如缩宫素效价测定的子宫收缩法［量反应平行线测定法随机取组设计（2.2）法］，胰岛素效价测定的小鼠血糖法［量反应平行线测定法双交叉设计（2.2）法］等。

三、统计分析

（一）直接测定法的统计方法

直接测定法即直接测得药物对各个动物最小效量或最小致死量的检定方法。如洋地黄及其制剂的效价测定。

1. 效价计算

按式（4-1）～式（4-3）计算 M、R 和 P_T。

$$M=\bar{x}_S-\bar{x}_T \tag{4-1}$$

$$R=\text{antilg}(\bar{x}_S-\bar{x}_T)=\text{antilg}M \tag{4-2}$$

$$P_T=A_TR \tag{4-3}$$

2. 误差项及可信限计算

按式（4-4)～式（4-8）计算 s^2、S_M 及 R 或 P_T 的 FL 和 FL%。

$$s^2=\frac{\sum x_S^2-\frac{(\sum x_S)^2}{n_S}+\sum x_T^2-\frac{(\sum x_T)^2}{n_T}}{n_S+n_T-2} \tag{4-4}$$

$f=n_S+n_T-2$，用此自由度查表 4-1 得 t 值。

$$S_M=\sqrt{s^2\times\frac{n_S+n_T}{n_Sn_T}} \tag{4-5}$$

$$R\text{ 的 FL}=\text{antilg}(M\pm tS_M) \tag{4-6}$$

antilg（$M+tS_M$）是 R 的高限，antilg（$M-tS_M$）是 R 的低限。

$$P_T\text{ 的 FL}=A_T\ \text{antilg}(M\pm tS_M) \tag{4-7}$$

$A_T\cdot$antilg（$M+tS_M$）是 P_T 的高限，$A_T\cdot$antilg（$M-tS_M$）是 P_T 的低限。

$$R(\text{或 } P_T)\text{的 FL\%}=\frac{R(\text{或 } P_T)\text{高限}-R(\text{或 } P_T)\text{低限}}{2R(\text{或 } 2P_T)}\times 100\% \tag{4-8}$$

当两批以上供试品（T、U…）和标准品同时比较时，按式（4-9）计算 S、T、U 的合并方差 s^2。

$$s^2=\frac{\sum x_S^2-\frac{(\sum x_S)^2}{n_S}+\sum x_T^2-\frac{(\sum x_T)^2}{n_T}+\sum x_U^2-\frac{(\sum x_U)^2}{n_U}+\cdots}{n_S-1+n_T-1+n_U-1+\cdots} \tag{4-9}$$

$$f=n_S-1+n_T-1+n_U-1+\cdots$$

效价 P_T、P_U…则是 T、U 分别与 S 比较，按式（4-1）～式（4-3）计算。

x_S 和 x_T 为 S 和 T 组各只动物的对数最小致死量，它们的均值 $\bar{x}_T$ 和 $\bar{x}_S$ 为 S 和 T 的等反应剂量，n_S 和 n_T 为 S 和 T 组的动物数。

（二）量反应（平行线）测定法的统计方法

药物对生物体所引起的反应随着药物剂量的增加产生的量变可以测量者，称量反应。量反应检定用平行线测定法，要求在一定剂量范围内，S 和 T 的对数剂量 x 和反应或反应的特定函数 y 呈直线关系，当 S 和 T 的活性组分基本相同时，两直线平行。

量反应检定主要用中国药典收载的量反应鉴定（2.2）法、（3.3）法或（2.2.2）法、（3.3.3）法，即 S、T（或 U）各用 2 个剂量组或 3 个剂量组，统称（$k \cdot k$）法或（$k \cdot k \cdot k$）法；如果 S 和 T 的剂量组数不相等，则称（$k \cdot k'$）法；前面的 k 代表 S 的剂量组数，后面的 k 或 k' 代表 T 的剂量组数。一般都是按（$k \cdot k$）法实验设计，当 S 或 T 的端剂量所致的反应未达阈值，或趋于极限，去除此端剂量后，对数剂量和反应的直线关系成立，这就形成了（$k \cdot k'$）法。例如（3.3）法设计就可能形成（2.3）或（3.2）法等。因此，（$k \cdot k'$）法中的 k 只可能比 k' 多一组或少一组剂量。（$k \cdot k'$）法的计算结果可供重复试验时调节剂量或调整供试品估计效价时参考。无论是（$k \cdot k$）法、（$k \cdot k'$）法或（$k \cdot k \cdot k$）法，都以 K 代表 S 和 T 的剂量组数之和，故 $K=k+k$ 或 $K=k+k'$ 或 $K=k+k+k$。

对各种（$k \cdot k$）法的要求是：① S 和 T 相邻高低剂量组的比值（r）要相等，一般 r 用（1∶0.8）～（1∶0.5），$\lg r=I$；② 各剂量组的反应个数（m）应相等。

1．平行线测定的实验设计类型

根据不同的检定方法可加以限制的因级数采用不同的实验设计。主要有三种类型。

（1）随机设计　剂量组内不加因级限制，有关因子的各级随机分配到各剂量组。本设计类型的实验结果只能分离不同剂量（剂间）所致变异，如绒促性素的

生物检定。

（2）随机区组设计　将实验动物或实验对象分成区组，一个区组可以是一窝动物、一只双碟或一次实验。在剂量组内的各行间加以区组间（如窝间、碟间、实验次序间）的因级限制。随机区组设计要求每一区组的容量（如每一窝动物的受试动物只数、每一只双碟能容纳的小杯数等）必须和剂量组数相同，这样可以使每一窝动物或每一只双碟都能接受到各个不同的剂量。因此，随机区组设计除了从总变异中分离剂间变异之外，还可以分离区组间变异，减小实验误差。例如抗生素杯碟法效价测定。

（3）交叉设计　同一动物可以分两次进行实验者适合用交叉设计。交叉设计是将动物分组，每组可以是一只动物，也可以是几只动物，但各组的动物只数应相等。标准品（S）和供试品（T）对比时，一组动物在第一次试验时接受 S 的一个剂量，第二次试验时则接受 T 的一个剂量，如此调换交叉进行，可以在同一动物身上进行不同试品、不同剂量的比较，以去除动物间差异对实验误差的影响，提高实验精确度，节约实验动物。

（2.2）法 S 和 T 各两组剂量，用双交叉设计，将动物分成四组；对各组中的每一只动物都标上识别号。每一只动物都按给药次序表进行两次实验（见表 4-2）。

表 4-2　双交叉设计两次实验的给药次序

项　目	第一组	第二组	第三组	第四组
第一次实验	d_{S_1}	d_{S_2}	d_{T_1}	d_{T_2}
第二次实验	d_{T_2}	d_{T_1}	d_{S_2}	d_{S_1}

2. 平行线测定法的方差分析和可靠性测验

A——随机设计和随机区组设计的方差分析和可靠性测验

（1）将反应值或其规定的函数（y）按 S 和 T 的剂量且分组列成方阵表（见表 4-3）

表 4-3　剂量分组方阵表

项　目		S 和 T 的剂量组					总和 Σy_m
		(1)	(2)	(3)	…	(k)	
行间（组内）	1	$y_{1(1)}$	$y_{1(2)}$	$y_{1(3)}$	…	$y_{1(k)}$	Σy_1
	2	$y_{2(1)}$	$y_{2(2)}$	$y_{2(3)}$	…	$y_{2(k)}$	Σy_2
	3	$y_{3(1)}$	$y_{3(2)}$	$y_{3(3)}$	…	$y_{3(k)}$	Σy_3
	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮		⋮
	m	$y_{m(1)}$	$y_{m(2)}$	$y_{m(3)}$	…	$y_{m(k)}$	Σy_m
总和	$\Sigma y_{(k)}$	$\Sigma y_{(1)}$	$\Sigma y_{(2)}$	$\Sigma y_{(3)}$	…	$\Sigma y_{(k)}$	Σy

方阵中，K 为 S 和 T 的剂量组数和，m 为各剂量组内 y 的个数，如为随机区组设计，m 为行间或组内所加的因级限制；n 为反应的总个数，$n=mK$。

（2）特异反应剔除和缺项补足

① 特异反应剔除　在同一剂量组内的各个反应中，如出现个别特大或特小的反应，应按下法判断其是否可以剔除。

设 y_a 表示特异反应值（或其规定的函数），y_m 为与 y_a 相对的另一极端的反应值，y_2、y_3 为与 y_a 最接近的两个反应值，y_{m-1}、y_{m-2} 为与 y_m 最接近的两个反应值，m 是该剂量组内的反应个数，将各数值按大小次序排列如下：y_a、y_2、$y_3 \cdots y_{m-2}$、y_{m-1}、y_m。

如 y_a 为特大值，则依次递减，y_m 最小；如 y_a 为特小值，则依次递升，y_m 最大。按式（4-10）～式（4-12）计算 J 值。

当 $m=3 \sim 7$ 时：

$$J_1=\frac{y_2-y_a}{y_m-y_a} \tag{4-10}$$

当 $m=8 \sim 13$ 时：

$$J_2=\frac{y_3-y_a}{y_{m-1}-y_a} \tag{4-11}$$

当 $m=14 \sim 20$ 时：

$$J_3=\frac{y_3-y_a}{y_{m-2}-y_a} \tag{4-12}$$

如 J 的计算值大于表 4-4 中规定的相应数值时，y_a 即可剔除。

表 4-4　特异反应值剔除表

m	3	4	5	6	7		
J_1	0.98	0.85	0.73	0.64	0.59		
m	8	9	10	11	12	13	
J_2	0.78	0.73	0.68	0.64	0.61	0.58	
m	14	15	16	17	18	19	20
J_3	0.60	0.58	0.56	0.54	0.53	0.51	0.50

② 缺项补足　因反应值被剔除或因反应值缺失造成缺项，致使 m 不等时，根据实验设计类型做缺项补足，使各剂量组的反应个数 m 相等。

随机设计（类型）实验的缺项补足：对缺失数据的剂量组，以该组的反应均值补入，缺 1 个反应补 1 个均值，缺 2 个反应补 2 个均值。

随机区组设计（类型）实验的缺项补足：按式（4-13）计算，补足缺项。

$$\text{缺项 } y=\frac{KC+mR-G}{(K-1)(m-1)} \tag{4-13}$$

式中，C 为缺项所在剂量组内的反应值总和；R 为缺项所在行的反应值总和；G 为全部反应值总和。

如果缺 1 项以上，可以分别以 y_1、y_2、y_3 等代表各缺项，然后在计算其中之一时，把其他缺项 y 直接用符号 y_1、y_2 等当作未缺项代入式（4-13），这样可得与缺项数相同的方程组，解方程组即得。

随机区组设计，当剂量组内安排的区组数较多时，也可将缺项所在的整个区组除去。

随机设计的实验结果中，如在个别剂量组多出 1～2 个反应值，可按严格的随机原则去除，使各剂量组的反应个数 m 相等。

不论哪种实验设计，每补足一个缺项，就需把 s^2 的自由度减去 1，缺项不得超过反应总个数的 5%。

（3）方差分析

方阵表（表 4-3）的实验结果，按式（4-14）～式（4-21）计算各项变异的差方和、自由度（f）及误差项的方差（s^2）。

① 随机设计　按式（4-14）、式（4-15）计算差方和$_{(总)}$、差方和$_{(剂间)}$。按式（4-20）计算差方和$_{(误差)}$。按式（4-18）或式（4-21）计算 s^2。

② 随机区组设计按式（4-14）～式（4-17）计算差方和$_{(总)}$、差方和$_{(剂间)}$、差方和$_{(区间组)}$、差方和$_{(误差)}$。按式（4-18）或式（4-19）计算（s^2）。

$$差方和_{(总)}=\sum y^2-\frac{(\sum y)^2}{mK} \tag{4-14}$$

$$f_{(总)}=mK-1$$

$$差方和_{(剂间)}=\frac{\sum[\sum y_{(k)}]^2}{m}-\frac{(\sum y)^2}{mK} \tag{4-15}$$

$$f_{(剂间)}=K-1$$

$$差方和_{(区组间)}=\frac{\sum(\sum y_m)^2}{K}-\frac{(\sum y)^2}{mK} \tag{4-16}$$

$$f_{(区组间)}=m-1$$

$$差方和_{(误差)}=差方和_{(总)}-差方和_{(剂间)}-差方和_{(区组间)} \tag{4-17}$$

$$f_{(误差)}=f_{(总)}-f_{(剂间)}-f_{(区组间)}=(K-1)(m-1)$$

$$各变异项方差=\frac{各变异项差方和}{各变异项自由度},$$

$$误差项方差\ (s^2)\ =\frac{方差和_{(误差)}}{f_{(误差)}} \tag{4-18}$$

或

$$s^2=\frac{Km\sum y^2-K\cdot\sum[\sum y_{(k)}]^2-m\cdot\sum(\sum y_m)^2+(\sum y)^2}{Km\ (K-1)\ (m-1)} \tag{4-19}$$

$$f=(K-1)(m-1)$$

$$差方和_{(误差)}=差方和_{(总)}-差方和_{(剂间)} \tag{4-20}$$

$$f_{(误差)}=f_{(总)}-f_{(剂间)}=K(m-1)$$

$$s^2=\frac{m\sum y^2-\sum[\sum y_{(k)}]^2}{K_m(m-1)} \tag{4-21}$$

$$f=K(m-1)$$

（4）可靠性测验

通过对剂间变异的分析，以测验 S 和 T 的对数剂量和反应的关系是否显著偏离平行直线。(2.2) 法和 (2.2.2) 法的剂间变异分析为试品间、回归、偏离平行三项，其他 $(k\cdot k)$ 法还需再分析二次曲线、反向二次曲线等。

① 可靠性测验的剂间变异分析

$(k\cdot k)$ 和 $(k\cdot k')$ 法：按表 4-5 计算各变异项的 $m\cdot\sum C_i^2$ 及 $\sum[C_i\cdot\sum y_{(k)}]$，按式 (4-22) 计算各项变异的差方和。

$$\text{各项变异的差方和}=\frac{[\sum(C_i\cdot\sum y_{(k)})]^2}{m\cdot\sum C_i^2} \tag{4-22}$$

$$f=1$$

$(k\cdot k\cdot k)$ 法：按式 (4-23)、式 (4-24) 计算试品间差方和。

表 4-5　$(k\cdot k)$ 和 $(k\cdot k')$ 法可靠性测验正交多项系数表

方法	变异来源	$\sum y_{(k)}$ 的正交多项系数 (C_i)								$m\cdot\sum C_i^2$	$\sum[C_i\cdot\sum y_{(k)}]$
		S_1	S_2	S_3	S_4	T_1	T_2	T_3	T_4		
(2.2)	试品间	−1	−1			1	1			$4m$	$T_2+T_1-S_2-S_1$
	回归	−1	1			−1	1			$4m$	$T_2-T_1+S_2-S_1$
	偏离平行	1	−1			−1	1			$4m$	$T_2-T_1-S_2+S_1$
(3.3)	试品间	−1	−1	−1		1	1	1		$6m$	$T_3+T_2+T_1-S_3-S_2-S_1$
	回归	−1	0	1		−1	0	1		$4m$	$T_3-T_1+S_3-S_1$
	偏离平行	1	0	−1		−1	0	1		$4m$	$T_3-T_1-S_3+S_1$
	二次曲线	1	−2	1		1	−2	1		$12m$	$T_3-2T_2+T_1+S_3-2S_2+S_1$
	反向二次曲线	−1	2	−1		1	−2	1		$12m$	$T_3-2T_2+T_1-S_3+2S_2-S_1$
(4.4)	试品间	−1	−1	−1	−1	1	1	1	1	$8m$	$T_4+T_3+T_2+T_1-S_4-S_3-S_2-S_1$
	回归	−3	−1	1	3	−3	−1	1	3	$40m$	$3T_4+T_3-T_2-3T_1+3S_4+S_3-S_2-3S_1$
	偏离平行	3	1	−1	−3	−3	−1	1	3	$40m$	$3T_4+T_3-T_2-3T_1-3S_4-S_3+S_2+3S_1$
	二次曲线	1	−1	−1	1	1	−1	−1	1	$8m$	$T_4-T_3-T_2+T_1+S_4-S_3-S_2+S_1$
	反向二次曲线	−1	1	1	−1	1	−1	−1	1	$8m$	$T_4-T_3-T_2+T_1-S_4+S_3+S_2-S_1$
(3.2)	试品间	−2	−2	−2		3	3			$30m$	$3(T_2+T_1)-2(S_3+S_2+S_1)$
	回归	−2	0	2		−1	1			$10m$	$T_2-T_1+2(S_3-S_1)$
	偏离平行	1	0	−1		−2	2			$10m$	$2(T_2-T_1)-S_3+S_1$
	二次曲线	1	−2	1		0	0			$6m$	$S_3-2S_2+S_1$
(4.3)	试品间	−3	−3	−3	−3	4	4	4		$84m$	$4(T_3+T_2+T_1)-3(S_4+S_3+S_2+S_1)$
	回归	−3	−1	1	3	−2	0	2		$28m$	$2(T_3-T_1)+3(S_4-S_1)-S_2+S_3$
	偏离平行	3	1	−1	−3	−5	0	5		$70m$	$5(T_3-T_1)-3(S_4-S_1)-S_3+S_2$
	二次曲线	3	−3	−3	3	2	−4	2		$60m$	$2(T_3+T_1)-4T_2+3(S_4-S_3-S_2+S_1)$
	反向二次曲线	−1	1	1	−1	1	−2	1		$10m$	$T_3-2T_2+T_1-S_4+S_3+S_2-S_1$

注：用 (2.3) 法及 (3.4) 法时，分别将 (3.2) 法及 (4.3) 法中 S 和 T 的正交多项系数互换即得。

(2.2.2) 法

$$差方和_{(试品间)}=\frac{(S_2+S_1)^2+(T_2+T_1)^2+(U_2+U_1)^2}{2m}-\frac{(\sum y)^2}{mK} \quad (4\text{-}23)$$

$$f=2$$

(3.3.3) 法

$$差方和_{(试品间)}=\frac{(S_1+S_2+S_3)^2+(T_1+T_2+T_3)^2+(U_1+U_2+U_3)^2}{3m}-\frac{(\sum y)^2}{mK} \quad (4\text{-}24)$$

$$f=2$$

按表 4-6 计算回归、二次曲线、反向二次曲线各项变异的 $m\cdot\sum C_i^2$ 及 $[\sum C_i\cdot\sum y_{(k)}]$；按式 (4-22) 计算差方和$_{(回归)}$、差方和$_{(二次曲线)}$。

表 4-6 (k·k·k) 法可靠性测验正交多项系数表

方法	变异来源	$\sum y_{(k)}$的正交多项系数(C_i) S_1 S_2 S_3	T_1 T_2 T_3	U_1 U_2 U_3	$m\cdot\sum C_i^2$	$\sum[C_i\cdot\sum y_{(k)}]$
(2.2.2)	回归	−1 1	−1 1	−1 1	6m	$S_2-S_1+T_2-T_1+U_2-U_1$
	偏离	1 −1	−1 1		4m	$T_2-T_1-S_2+S_1$
	平行	1 −1		−1 1	4m	$U_2-U_1-S_2+S_1$
			1 −1	−1 1	4m	$U_2-U_1-T_2+T_1$
(3.3.3)	回归	−1 0 1	−1 0 1	−1 0 1	6m	$U_3-U_1+T_3-T_1+S_3-S_1$
	偏离	1 0 −1	−1 0 1		4m	$T_3-T_1-S_3+S_1$
	平行	1 0 −1		−1 0 1	4m	$U_3-U_1-S_3+S_1$
			1 0 −1	−1 0 1	4m	$U_3-U_1-T_3+T_1$
	二次曲线	1 −2 1	1 −2 1	1 −2 1	18m	$U_3-2U_2+U_1+T_3-2T_2+T_1+S_3-2S_2+S_1$
	反向二	−1 2 −1	1 −2 1		12m	$T_3-2T_2+T_1-S_3+2S_2-S_1$
	次曲线	−1 2 −1		1 −2 1	12m	$U_3-2U_2+U_1-S_3+2S_2-S_1$
			−1 2 −1	1 −2 1	12m	$U_3-2U_2+U_1-T_3+2T_2-T_1$

按式 (4-25) 可计算偏离平行的差方和及反向二次曲线的差方和。

$$差方和_{(偏离平行)}、差方和_{(反向二次曲线)}=\frac{2\sum[\sum(C_i\cdot\sum y_{(k)})]^2}{\sum(m\cdot\sum C_i^2)} \quad (4\text{-}25)$$

$$f=2$$

按式 (4-18) 计算各项变异的方差。

表中 S_1，S_2，…，T_1，T_2…，在量反应分别为标准品和供试品每一剂量组内的反应值或它们规定函数的总和 [相当于表 4-3 的 $\sum y_{(k)}$ 各项]。所有足序 1，2，3…都是顺次由小剂量到大剂量，C_i 是与之相应的正交多项系数，$m\cdot\sum C_i^2$ 是该项变异各正交多项系数的平方之和与 m 的乘积，$\sum[C_i\cdot\sum y_{(k)}]$ 为 S_1，S_2，…，T_1，T_2，…分别与该项正交多项系数乘积之和。

将方差分析结果列表进行可靠性测验。例如，随机区组设计（3.3）法可靠性测验结果列表（表 4-7）。

表 4-7　随机区组设计（3.3）法可靠性测验结果

变异来源	f	差方和	方差	F	P
试品间	1	式(4-22)	差方和/f	方差/s^2	
回归	1	式(4-22)	差方和/f	方差/s^2	
偏离平行	1	式(4-22)	差方和/f	方差/s^2	
二次曲线	1	式(4-22)	差方和/f	方差/s^2	
反向二次曲线	1	式(4-22)	差方和/f	方差/s^2	
剂间	$K-1$	式(4-15)	差方和/f	方差/s^2	
区组间	$m-1$	式(4-16)	差方和/f	方差/s^2	
误差	$(K-1)(m-1)$	式(4-17)	差方和/$f(S^2)$		
总	$mK-1$	式(4-14)			

表 4-7 中概率 P 是以该变异项的自由度为分子，误差项（s^2）的自由度为分母，查 F 值表（表 4-8），将查表所得 F 值与表 4-7F 项下的计算值比较而得。当 F 计算值大于 $P=0.05$ 或 $P=0.01$ 的查表值时，则 $P<0.05$ 或 $P<0.01$，即为在此概率水平下该项变异有显著意义。

随机设计没有区组间变异项。

表 4-8　F 值表

项目		f_1(分子的自由度)								
		1	2	3	4	6	12	20	40	∞
f_2(分母的自由度)	1	161	200	216	225	234	244	248	251	254
		4052	4999	5403	5625	5859	6106	6208	6286	6366
	2	18.51	19.00	19.16	19.25	19.33	19.41	19.44	19.47	19.50
		98.49	99.00	99.17	90.25	99.33	99.42	99.45	99.48	99.50
	3	10.13	9.55	9.28	9.12	8.94	8.74	8.66	8.60	8.53
		34.12	30.82	29.46	28.71	27.91	27.05	26.69	26.41	26.12
	4	7.71	6.94	6.59	6.39	6.16	5.19	5.80	5.71	5.63
		21.20	18.00	16.69	15.98	15.21	14.37	14.02	13.74	13.46
	5	6.61	5.79	5.41	5.19	4.95	4.68	4.56	4.46	4.36
		16.26	13.27	12.06	11.39	10.67	9.89	9.55	9.29	9.02
	6	5.99	5.14	4.76	4.53	4.28	4.00	3.87	3.77	3.67
		13.74	10.92	9.78	9.15	8.47	7.72	7.39	7.14	6.88
	7	5.59	4.74	4.35	4.12	3.87	3.57	3.44	3.34	3.23
		12.25	9.55	8.45	7.85	7.19	6.47	6.15	5.90	5.65
	8	5.32	4.46	4.07	3.84	3.58	3.28	3.15	3.05	2.93
		11.26	8.65	7.59	7.01	6.37	5.67	5.36	5.11	4.86
	9	5.12	4.26	3.86	3.63	3.37	3.07	2.93	2.82	2.71
		10.56	8.02	6.99	6.42	5.80	5.11	4.80	4.56	4.31
	10	4.96	4.10	3.71	3.48	3.22	2.91	2.77	2.67	2.54

续表

项目		f_1（分子的自由度）								
		1	2	3	4	6	12	20	40	∞
f_2（分母的自由度）	10	10.04	7.56	6.55	5.99	5.39	4.71	4.41	4.17	3.91
	15	4.54	3.68	3.29	3.06	2.79	2.48	2.33	2.21	2.07
		8.68	6.36	5.42	4.89	4.32	3.67	3.36	3.12	2.87
	20	4.35	3.49	3.10	2.87	2.60	2.28	2.12	1.99	1.84
		8.10	5.85	4.94	4.43	3.87	3.23	2.94	2.69	2.42
	30	4.17	3.32	2.92	2.69	2.42	2.09	1.93	1.79	1.62
		7.56	5.39	4.51	4.02	3.47	2.84	2.55	2.29	2.01
	40	4.08	3.23	2.84	2.61	2.34	2.00	1.84	1.69	1.51
		7.31	5.18	4.31	3.83	3.29	2.66	2.37	2.11	1.81
	60	4.00	3.15	2.76	2.52	2.25	1.92	1.75	1.59	1.39
		7.08	4.98	4.13	3.65	3.12	2.50	2.20	1.93	1.60
	∞	3.84	2.99	2.60	2.37	2.09	1.75	1.57	1.40	1.00
		6.64	4.60	3.78	3.32	2.80	2.18	1.87	1.59	1.00

注：上行，$P=0.05$；下行，$P=0.01$。

② 可靠性测验结果判断　可靠性测验结果，回归项应非常显著（$P<0.01$）。(2.2) 法、(2.2.2) 法偏离平行应不显著（$P>0.05$）。其他 $(k \cdot k)$ 法、$(k \cdot k \cdot k)$ 法偏离平行、二次曲线、反向二次曲线各项均应不显著（$P>0.05$）。试品间一项不作为可靠性测验的判断标准，试品间变异非常显著者，重复试验时，应参考所得结果重新估计 T 的效价或重新调整剂量试验。

B——双交叉设计的方差分析和可靠性测验

(1) 双交叉设计实验结果的方阵表　将动物按体重随机分成四组，各组的动物数（m）相等，四组的动物总数为 $4m$。对四组中的每一只动物都加以识别标记，按双交叉设计给药次序表进行实验，各组的每一只动物都给药两次，共得 $2\times 4m$ 个反应值。将 S、T 各两个剂量组两次实验所得反应值排列成表，见表 4-9。

表 4-9　双交叉实验结果

项目	第一组			第二组			第三组			第四组			
	第(1)次	第(2)次	两次反应和	第(1)次	第(2)次	两次反应和	第(1)次	第(2)次	两次反应和	第(1)次	第(2)次	两次反应和	
	d_{S_1}	d_{S_2}		d_{S_2}	d_{T_1}		d_{T_1}	d_{S_2}		d_{T_2}	d_{S_1}		
y	$y_{S_1(1)}$ ⋮	$y_{T_2(2)}$ ⋮	$y_{(1)}+y_{(2)}$ ⋮	$y_{S_2(1)}$ ⋮	$y_{T_1(2)}$ ⋮	$y_{(1)}+y_{(2)}$ ⋮	$y_{T_1(1)}$ ⋮	$y_{S_2(2)}$ ⋮	$y_{(1)}+y_{(2)}$ ⋮	$y_{T_2(1)}$ ⋮	$y_{S_1(2)}$ ⋮	$y_{(1)}+y_{(2)}$ ⋮	总和
Σ	$S_{1(1)}$	$T_{2(2)}$		$S_{2(1)}$	$T_{1(2)}$		$T_{1(1)}$	$S_{2(2)}$		$T_{2(1)}$	$S_{1(2)}$		S_1 S_2 T_1 T_2

（2）缺项补足　表 4-9 中如有个别组的 1 个反应值因故缺失，均作该只动物缺失处理，在组内形成两个缺项。此时，可分别用两次实验中该组动物其余各反应值的均值补入；也可在其余三组内用严格随机的方法各去除一只动物，使各组的动物数相等。每补足一个缺项，误差（Ⅰ）和误差（Ⅱ）的方差 s_{I}^2 和 s_{II}^2 的自由度都要减去 1。缺项不得超过反应总个数的 5%。同一组内缺失的动物不得超过 1 只。

（3）方差分析　双交叉设计的总变异中，包含有动物间变异和动物内变异。对表 4-9 的 $2\times4m$ 个反应值进行方差分析时，总变异的差方和$_{(总)}$按式（4-26）计算。

$$差方和_{(总)}=\sum y^2-\frac{(\sum y)^2}{2\times4m} \tag{4-26}$$

$$f_{(总)}=2\times4m-1$$

动物间变异是每一只动物两次实验所得反应值的和（表 4-9 每组动物的第三列）之间的变异，其差方和按式（4-27）计算。

$$差方和_{(动物间)}=\frac{\sum[y_{(1)}+y_{(2)}]^2}{2}-\frac{(\sum y)^2}{2\times4m} \tag{4-27}$$

$$f_{(动物间)}=4m-1$$

总变异中分除动物间变异，余下为动物内变异。

动物间变异和动物内变异的分析：将表 4-9 中 S 和 T 各剂量组第（1）次实验所得反应值之和 $S_{1(1)}$、$S_{2(1)}$、$T_{1(1)}$、$T_{2(1)}$ 及第（2）次实验反应值之和 $S_{1(2)}$、$S_{2(2)}$、$T_{1(2)}$、$T_{2(2)}$ 按表 4-10 双交叉设计正交系数表计算各项变异的 $m\cdot\sum C_i^2$ 及 $\sum(C_i\cdot\sum y)$，按式（4-22）计算各项变异的差方和。

总变异的差方和减去动物间变异的差方和，再减去动物内各项变异的差方和，余项为误差（Ⅰ）的差方和，按式（4-28）计算。

$$\begin{aligned}差方和_{(误差\text{I})}=&差方和_{(总)}-差方和_{(动物间)}-差方和_{(试品间)}-差方和_{(回归)}-\\&差方和_{(次间)}-差方和_{(次间\times偏离平行)}\end{aligned} \tag{4-28}$$

$$\begin{aligned}f_{(误差\text{I})}&=f_{(总)}-f_{(动物间)}-f_{(试品间)}-f_{(回归)}-f_{(次间)}-f_{(次间\times偏离平行)}\\&=4\ (m-1)\end{aligned}$$

误差（Ⅰ）的差方 s^2，用以计算实验误差 S_M、FL，以及进行动物内各项变异（表 4-10 中 * 标记者）的 F 测验。

误差（Ⅱ）的差方和为动物间变异的差方和减去表 4-10 中其余三项变异（无 * 标记者）的差方和，按式（4-29）计算。

$$\begin{aligned}差方和_{(误差\text{II})}=&差方和_{(动物间)}-差方和_{(偏离平行)}-差方和_{(次间\times试品间)}\\&-差方和_{(次间\times回归)}\end{aligned} \tag{4-29}$$

$$\begin{aligned}f_{(误差\text{II})}&=f_{(动物间)}-f_{(偏离平行)}-f_{(次间\times试品间)}-f_{(次间\times回归)}\\&=4\ (m-1)\end{aligned}$$

误差（Ⅱ）的方差 $s_{Ⅱ}^{2}$ 用以进行上述三项变异的 F 测验。

表 4-10 双交叉设计正交系数表

变异来源	第(1)次实验				第(2)次实验				$m \cdot \sum C_i^2$	$\sum(C_i \cdot \sum y)$
	$S_{1(1)}$	$S_{2(1)}$	$T_{1(1)}$	$T_{2(1)}$	$S_{1(2)}$	$S_{2(2)}$	$T_{1(2)}$	$T_{2(2)}$		
	正交多项系数 C_i									
试品间*	−1	−1	1	1	−1	−1	1	1	$8m$	$T_{2(1)}+T_{1(1)}-S_{2(1)}-S_{1(1)}+T_{2(2)}+T_{1(2)}-S_{2(2)}-S_{1(2)}$
回归*	−1	1	−1	1	−1	1	−1	1	$8m$	$T_{2(1)}-T_{1(1)}+S_{2(1)}-S_{1(1)}+T_{2(2)}-T_{1(2)}+S_{2(2)}-S_{1(2)}$
偏离平行	1	−1	−1	1	1	−1	−1	1	$8m$	$T_{2(1)}-T_{1(1)}+S_{2(1)}+S_{1(1)}+T_{2(2)}-T_{1(2)}-S_{2(2)}+S_{1(2)}$
次间*	−1	−1	−1	−1	1	1	1	1	$8m$	$T_{2(2)}+T_{1(2)}+S_{2(2)}+S_{1(2)}-T_{2(1)}-T_{1(1)}-S_{2(1)}-S_{1(1)}$
次间×试品间	1	1	−1	−1	−1	−1	1	1	$8m$	$T_{2(2)}+T_{1(2)}-S_{2(2)}-S_{1(2)}-T_{2(1)}-T_{1(1)}+S_{2(1)}+S_{1(1)}$
次间×回归	1	−1	1	−1	−1	1	−1	1	$8m$	$T_{2(2)}-T_{1(2)}+S_{2(2)}-S_{1(2)}-T_{2(1)}+T_{1(1)}-S_{2(1)}+S_{1(1)}$
次间×偏离平行*	−1	1	1	−1	1	−1	−1	1	$8m$	$T_{2(2)}-T_{1(2)}-S_{2(2)}+S_{1(2)}-T_{2(1)}+T_{1(1)}+S_{2(1)}-S_{1(1)}$

注：各项变异的自由度均为1；有 * 号标记的四项为动物内变异，其余为动物间变异。

（4）可靠性测验　将方差分析及 F 测验的结果列表（表 4-11）。表 4-11 中的概率 P，计算同表 4-7，但表的上半部分是以 $s_{Ⅱ}^{2}$ 的自由度为分母，表的下半部分以 s^2 的自由度为分母，查 F 值表（表 4-8），将查表所得的 F 值与表 4-11F 项下的计算值比较而得。

表 4-11 双交叉设计可靠性测验结果

变异来源	f	差方和	方差	F	P
偏离平行	1	式(4-22)	差方和/f	方差/$s_{Ⅱ}^{2}$	
次间×试品间	1	式(4-22)	差方和/f	方差/$s_{Ⅱ}^{2}$	
次间×回归	1	式(4-22)	差方和/f	方差/$s_{Ⅱ}^{2}$	
误差Ⅱ	$4(m-1)$	式(4-29)	差方和/$f(s_{Ⅱ}^{2})$		
动物间	$4m-1$	式(4-27)	差方和/f	方差/s^2	
试品间	1	式(4-22)	差方和/f	方差/s^2	
回归	1	式(4-22)	差方和/f	方差/s^2	
次间	1	式(4-22)	差方和/f	方差/s^2	
次间×偏离平行	1	式(4-22)	差方和/f	方差/s^2	
误差Ⅰ	$4(m-1)$	式(4-28)	差方和/$f(s^2)$		
总	$2\times4m-1$	式(4-26)			

可靠性测验结果判断：回归、偏离平行、试品间三项的判断标准同（2.2）法。

次间×试品间、次间×回归、次间×偏离平行三项中，如有 F 测验非常显著者，说明该项变异在第一次和第二次实验的结果有非常显著的差别，对出现这种情况的检定结果，下结论时应慎重，最好复试。

3. 效价（P_T）及可信限（FL）计算

各种（$k \cdot k$）法都按表 4-12 计算 V、W、D、A、B、g 等数值，代入式（4-30）～式（4-33）及式（4-3）、式（4-8）计算 R、P_T、S_M，以及 R、P_T 的 FL 和 FL%等。

$$R = D \cdot \text{antilg} \frac{IV}{W} \tag{4-30}$$

$$S_M = \frac{I}{W^2(1-g)} \sqrt{ms^2 \left[(1-g)AW^2 + BV^2 \right]} \tag{4-31}$$

$$R \text{ 的 FL} = \text{antilg} \left[\frac{\lg R}{1-g} \pm t \cdot S_M \right] \tag{4-32}$$

$$P_T \text{ 的 FL} = A_T \cdot \text{antilg} \left[\frac{\lg R}{1-g} \pm t \cdot S_M \right] \tag{4-33}$$

（2.2）法双交叉设计：计算方法同上述（2.2）法。双交叉设计各剂量组都进行两次试验，S 和 T 每一剂量组的反应值个数为组内动物数的两倍（$2m$）。

① 双交叉设计用 S 和 T 各组剂量两次试验所得各反应值之和（表 4-9 中的 S_1、S_2、T_1、T_2）按表 4-12（2.2）法公式计算 V、W、D、g 等数值。

表 4-12　量反应平行线鉴定法的计算公式

方法（$k_1 \cdot k_2$）	S	T	效价计算用数值			S_M 计算用数值		
			V	W	D	A	B	g
2.2	$d_{S_1}\, d_{S_2}$	$d_{T_1}\, d_{T_2}$	$\frac{1}{2}(T_1+T_2-S_1-S_2)$	$\frac{1}{2}(T_2-T_1+S_2-S_1)$	$\frac{d_{S_2}}{d_{T_2}}$	1	1	$\frac{t^2s^2m}{W^2}$
3.3	$d_{S_1}\, d_{S_2}\, d_{S_3}$	$d_{T_1}\, d_{T_2}\, d_{T_3}$	$\frac{1}{3}(T_1+T_2+T_3-S_1-S_2-S_3)$	$\frac{1}{4}(T_3-T_1+S_3-S_1)$	$\frac{d_{S_3}}{d_{T_3}}$	$\frac{2}{3}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{t^2s^2m}{4W^2}$
4.4	$d_{S_1}\, d_{S_2}\, d_{S_3}\, d_{S_4}$	$d_{T_1}\, d_{T_2}\, d_{T_3}\, d_{T_4}$	$\frac{1}{4}(T_1+T_2+T_3+T_4-S_1-S_2-S_3-S_4)$	$\frac{1}{20}[(T_3-T_2+S_3-S_2)+3(T_4-T_1+S_4-S_1)]$	$\frac{d_{S_4}}{d_{T_4}}$	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{10}$	$\frac{t^2s^2m}{10W^2}$
3.2	$d_{S_1}\, d_{S_2}\, d_{S_3}$	$d_{T_1}\, d_{T_2}$	$\frac{1}{2}(T_2+T_1)-\frac{1}{3}(S_1+S_2+S_3)$	$\frac{1}{5}[(T_2-T_1)+2(S_3-S_1)]$	$\frac{d_{S_3}}{d_{T_2}} \cdot \frac{1}{\sqrt{r}}$			
2.3	$d_{S_1}\, d_{S_2}$	$d_{T_1}\, d_{T_2}\, d_{T_3}$	$\frac{1}{3}(T_1+T_2+T_3)-\frac{1}{2}(S_1+S_2)$	$\frac{1}{5}[2(T_3-T_1)+(S_2-S_1)]$	$\frac{d_{S_2}}{d_{T_3}} \cdot \sqrt{r}$	$\frac{5}{6}$	$\frac{2}{5}$	$\frac{2t^2s^2m}{5W^2}$
4.3	$d_{S_1}\, d_{S_2}\, d_{S_3}\, d_{S_4}$	$d_{T_1}\, d_{T_2}\, d_{T_3}$	$\frac{1}{3}(T_1+T_2+T_3)-\frac{1}{4}(S_1+S_2+S_3+S_4)$	$\frac{1}{14}[2(T_3-T_1)+(S_3-S_2)+3(S_4-S_1)]$	$\frac{d_{S_4}}{d_{T_3}} \cdot \frac{1}{\sqrt{r}}$			

续表

方法 ($k_1 \cdot k_2$)	S	T	效价计算用数值			S_M 计算用数值		
			V	W	D	A	B	g
3.4	$d_{S_1}\,d_{S_2}\,d_{S_3}$	$d_{T_1}\,d_{T_2}$ $d_{T_3}\,d_{T_4}$	$\frac{1}{4}(T_1+T_2+T_3+T_4)-\frac{1}{3}(S_1+S_2+S_3)$	$\frac{1}{14}[2(S_3-S_1)+(T_3-T_2)+3(T_4-T_1)]$	$\frac{d_{S_3}}{d_{T_4}}\cdot\sqrt{r}$	$\frac{7}{12}$	$\frac{1}{7}$	$\frac{t^2s^2m}{7W^2}$
2.2.2	$d_{S_1}\,d_{S_2}$	$d_{T_1}\,d_{T_2}$ $d_{U_1}\,d_{U_2}$	$\frac{1}{2}(T_1+T_2-S_1-S_2)$ $\frac{1}{2}(U_1+U_2-S_1-S_2)$	$\frac{1}{3}(T_2-T_1+U_2-U_1+S_2-S_1)$	$\frac{d_{S_2}}{d_{T_2}}$ $\frac{d_{S2}}{d_{U2}}$	1	$\frac{2}{3}$	$\frac{2t^2s^2m}{3W^2}$
3.3.3	$d_{S_1}\,d_{S_2}\,d_{S_3}$	$d_{T_1}\,d_{T_2}\,d_{T_3}$ $d_{U_1}\,d_{U_2}\,d_{U_3}$	$\frac{1}{3}(T_1+T_2+T_3-S_1-S_2-S_3)$ $\frac{1}{3}(U_1+U_2+U_3-S_1-S_2-S_3)$	$\frac{1}{6}(T_3-T_1+U_3-U_1+S_3-S_1)$	$\frac{d_{S_3}}{d_{T_3}}$ $\frac{d_{S3}}{d_{U3}}$	$\frac{2}{3}$	$\frac{1}{6}$	$\frac{t^2s^2m}{6W^2}$

注：d_S、d_T 分别为 S 和 T 的剂量；下角 1、2、3 是顺次由小剂量到大剂量。

② 参照式（4-31）计算 S_M，因每只动物进行两次实验，式中 m 用 $2m$ 代替，（2. 2）法 $A=1$，$B=1$，S_M 的公式为：

$$S_M=\frac{I}{W^2(1-g)}\sqrt{2ms^2\left[(1-g)W^2+V^2\right]} \tag{4-34}$$

式中，s^2 为表 4-11 中（Ⅰ）方差；

$$g=\frac{s^2\cdot t^2\cdot 2m}{W^2}$$

4. 实验结果的合并计算

同一批供试品重复 n 次测定，所得 n 个测定结果，可用合并计算的方法求其效价 P_T 的均值及其 FL。

参加合并计算的 n 个结果应该是：

① 各个实验结果是独立的，完整的，是在动物来源、实验条件相同的情况下，与标准品同时比较所得的检定结果（P_T）。

② 各次检定结果，经用标示量或估计效价（A_T）校正后，取其对数值（$\lg P_T$）参加合并计算。

计算时，令 $\lg P_T=M$。

n 次实验结果共 n 个 M 值，按式（4-35）进行 χ^2 测验：

$$\chi^2=\sum WM^2-\frac{(\sum WM)^2}{\sum W} \tag{4-35}$$

$$f=n-1$$

式中，W 为各次实验结果的权重，相当于各次实验 S_M 平方的倒数，即：

$$W=\frac{1}{S_M^2} \tag{4-36}$$

按式（4-35）的自由度（f）查 χ^2 值表，得 $\chi^2_{(f)0.05}$ 查表值；当 χ^2 计算值小于 $\chi^2_{(f)0.05}$ 查表值时，认为 n 个实验结果均一，可按式（4-37）、式（4-38）、式（4-39）计算 n 个 M 的加权均值 $\overline{M}$、$S_{\overline{M}}$ 及其 FL。

$$\overline{M}=\frac{\sum WM}{\sum W} \tag{4-37}$$

$$S_{\overline{M}}=\sqrt{\frac{1}{\sum W}} \tag{4-38}$$

合并计算的自由度（f）是 n 个实验结果的 s^2 自由度之和。$f=\sum fi$，按此 f 查 t 值表（表 4-1）得 t 值。

$$\overline{M}\text{ 的 FL}=\overline{M}\pm t\cdot S_{\overline{M}} \tag{4-39}$$

$\overline{P}_T$ 及其可信限按式（4-40）、式（4-41）计算：

$$\overline{P}_T=\text{antilg}\overline{M} \tag{4-40}$$

$$\overline{P}_T\text{ 的 FL}=\text{antilg}(\overline{M}\pm t\cdot S_{\overline{M}}) \tag{4-41}$$

FL%按式（4-8）计算。

当χ^2 计算值大于 $\chi^2_{(f)0.05}$ 查表值时，则 n 个实验结果不均一，可用以下方法进行合并计算。

① 如为个别实验结果影响 n 次实验结果的均一性，可以剔除个别结果，将其余均一的结果按以上公式进行合并计算。

② 如果 n 次实验结果的不均一性并非个别实验结果的影响，则按式（4-42）、式（4-43）计算 n 个 M 的不加权均值 $\overline{M}$ 及其 $S_{\overline{M}}$，再按式（4-39）、式（4-40）、式（4-41）计算 $\overline{M}$ 的 FL、$\overline{P}_T$ 及其 FL。

$$\overline{M}=\frac{\sum M}{n} \tag{4-42}$$

$$S_{\overline{M}}=\frac{S_M}{\sqrt{n}}=\sqrt{\frac{\sum M^2-\frac{(\sum M)^2}{n}}{n(n-1)}} \tag{4-43}$$

$$f=n-1$$

第三节　常用中药鉴定举例

1. 益母草

【来源】 本品为唇形科植物益母草（*Leonurus japonicus* Houtt.）的干燥地

上部分。

〖效价测定〗

（1）仪器　XETD0-264 台式平衡自动记录仪，501 型超级恒温器。

（2）试剂　缩宫素注射液（南京生物化学制药厂，批号为 980502,)，10U/mL，临用时以蒸馏水配成 0.02U/mL。缩宫素标准品（中国药品生物制品检定所，批号 0529-9801)，用新配制的 0.2%三氯叔丁醇溶液配制 1U/mL 的储备液（冰箱 4～8℃保存)，临用时以蒸馏水配制成 0.02mL。

（3）方法

① 样品液制备　新鲜益母草洗净，榨汁，滤过而得（1g/mL)。

② 动物效应模型　动情前期的大鼠离体子宫。SD 大鼠（同窝)，雌性，断乳后即与雄鼠隔离，体重（200±20)g。

③ 检定环境与过程

a. 检定环境　宫负荷 1g，浴温 32℃，每 1000mL 子宫营养液中 $CaCl_2$ 和 $NaHCO_3$ 分别为 0.06g 和 0.25g。

b. 检定过程　取上述大鼠，用阴道涂片法选择在动情前期中者，用硬物猛击大鼠头部致死，迅速剖腹取出子宫，置于盛有蓄养液的培养皿中，在宫角相连处剪开并清除残余结缔组织和脂肪，供实验的子宫用线结扎其阴道端，使缚于通气管的小钩上，让其位于浴槽的底部，再用线结扎卵巢端，与换能器相连。浴槽中预先盛有定量蓄养液（25mL)，能够完全浸没子宫。浴槽中连续均匀地通入 O_2 小泡（约 50 个/min)，调节浴槽水温为 32℃，使保持恒定，调节子宫肌负荷为 1.0g，静置 15min，待子宫肌适应后加入缩宫素或益母草（提取液)，记录子宫肌收缩，待收缩达到最高点开始松弛时停止记录，放去含有药液的蓄养液，用新的蓄养液洗涤 2 次，放去后再加入定量蓄养液，静置片刻，进行第 2 次加注药液，间隔时间每次相同，约 5min。

平衡记录仪的量程：20mV，纸速为 4mm/min。

（4）结果　见表 4-13、图 4-1、表 4-14、表 4-15、表 4-16。

表 4-13　益母草、缩宫素对大鼠离体子宫的剂量效应关系实测数据

实验动物	试验药物	不同剂量药液(mL)(对数剂量)引起子宫肌收缩高度(mm)					剂量反应相关系数(*r*)
		0.1(−1)	0.2(−0.699)	0.3(−0.523)	0.4(0.398)	0.6(−0.222)	
1	益母草	25	42	60	79	90	0.9856
	缩宫素	26	43	63	86	95	0.9789
2	益母草	12	20	36	55	75	0.9528
	缩宫素	15	24	47	69	85	0.9609
3	益母草	15	32	43	60	88	0.9635
	缩宫素	16	31	42	58	90	0.9668
4	益母草	17	25	50	80	92	0.9478

续表

实验动物	试验药物	不同剂量药液(mL)(对数剂量)引起子宫肌收缩高度(mm)					剂量反应相关系数(r)
		0.1(−1)	0.2(−0.699)	0.3(−0.523)	0.4(0.398)	0.6(−0.222)	
4	缩宫素	18	26	51	85	95	0.9417
5	益母草	15	21	47	74	90	0.9458
	缩宫素	13	24	52	81	92	0.9580
6	益母草	26	43	56	77	87	0.9819
	缩宫素	23	36	52	72	83	0.9654
6次均值	益母草	18.3	30.5	48.7	70.8	87.0	0.9629
	缩宫素	18.5	30.7	51.2	75.2	90.0	0.9620

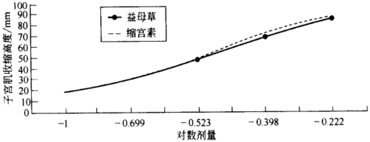


图 4-1　益母草和缩宫素的剂量效应关系

表 4-14　益母草和缩宫素回归线数据

回归线参数	a	b	r	n	f	斜率标准误差 S_b	T_{b1-b2}
益母草	103.21	91.77	0.9685	5	7	13.6227	0.2422
缩宫素	108.14	96.82	0.9672	5		14.6808	

表 4-15　益母草大鼠子宫四点法检定实测数据

组　别	益母草样品/mL		缩宫素标准品/mL	
	高剂量 0.6	低剂量 0.42	高剂量 0.6	低剂量 0.42
子宫肌收缩高度 y/mm	33	21	44	28
	69	28	67	31
	71	40	75	31
	70	33	73	55
	66	36	65	30
	75	44	60	29
总和 Y	384(T_2)	202(T_1)	384(S_2)	204(S_1)

表 4-16　益母草四点法检定方差分析

变异来源	自由度	均方	F	P	变异来源	自由度	均方	F	P
药品间	1	0.2	0.2	>0.05	组间	3	1820.2	15.3	<0.05
回归	1	5460.2	40.4	<0.05	误差	20	135.3		
偏离平行	1	0.2	0.2	>0.05					

【附】

① 益母草、缩宫素剂量效应关系　在一定剂量范围内，益母草的对数剂量与其引起的大鼠离体子宫肌收缩高度成较好的线性关系，缩宫素同样如此。在子宫肌收缩高度 20～85mm 的范围内，益母草和缩宫素各自的回归线基本平行。

② 益母草和缩宫素回归线的统计分析　表 4-14 中 a 和 b 分别为回归线的截距和斜率，r 是回归系数。自由度为：$f=(n_1+n_2)-3$，$S_b=\frac{b}{r}\sqrt{\frac{1-r^2}{n-2}}$，$t_b=\frac{|b_1-b_2|}{\sqrt{S_{b1}^2+S_{b1}^2}}=0.2422$，$t_{0.05}=2.3646$。

现在 $t_b(0.2422)<t_{0.05}(2.3646)$ 说明两线基本平行。即益母草与缩宫素引起子宫肌的收缩效应在 20～85mm 范围内，二者的对数剂量和反应高度回归线基本平行。

③ 效应模式的验证　药品间差异不显著（$P>0.05$），说明供试品与标准品效价无明显差别，供试品高剂量反应为 384，与 S_2（384）一样，且远大于 S_1（204），故剂量安排是合理的。回归间及组间差异有显著意义（$P<0.05$），说明实验剂量比例与实验安排较好。偏离平行的差异无显著意义（$P>0.05$），说明二线平行性检验合格，可以用四点法计算效价。

④ 可信限和效价的计算　第 1 次检定结果经计算益母草供试品效价 $P_T=$ 10U/mL×(0.8806～1.155)=8.806～11.155U/mL，P_T 的平均可信限率＝1.1745/9.9805＝11.8%。第 2 次检定结果经计算得益母草供试品效价 $P_T=$ 10U/mL×(0.8319～1.0648)=8.319～10.648U/mL，P_T 的平均可信限率＝1.165/9.484＝12.3%。第 3 次检定结果经计算得益母草供试品效价 $P_T=$10U/mL×(0.8046～1.1125)=8.046～11.125U/mL，P_T 的平均可信限率＝1.1539/9.5855＝16.1%。对该益母草样品在不同的标准子宫模型上重复检定 3 次，据此，同一样品 3 次检定的效价平均可信限率分别为 11.8%、12.3%和 16.1%，均在 20%以内。

2. 益母草制剂

【来源】 本品为唇形斜植物益母草（*Leonurus japonicus* Houtt.）的制剂。

【效价测定】

（1）材料　鲜益母草胶囊（浙江省中药研究所研制，批号 20010415），益母草流浸膏（杭州天力药业有限公司生产，批号 20010512）。

（2）仪器　XETD0-264 台式平衡自动记录仪，501 型超级恒温器。

（3）试剂　缩宫素标准品（中国药品生物制品检定所，批号为 0529-9801），先用新鲜配制的 0.2%三氯叔丁醇溶液配制成 1U/mL 的储备液，置 4～8℃冰箱

保存，临用时以蒸馏水配成 0.01U/mL。

（4）方法

① 样品液制备　取鲜益母草胶囊内容物用去离子水溶解，再滤过定容待用（每 1mL 相当于 0.205g 益母草）；益母草流浸膏实验时取内容物用去离子水稀释，再滤过定容待用（每 1mL 相当于 0.205g 益母草）。

② 实验模型制作　实验动物为大鼠（浙江省医学实验动物中心，合格证号为医动字第 2001001 号），SD 种，雌性，断乳后即与雄鼠隔离，体重为（200±20)g。取断乳后即与雄鼠隔离、体重在 180～220g 的雌性大鼠，用阴道涂片法选择动情前期中者，击头致死，取其子宫进行实验。

③ 实验条件与操作过程　子宫负荷为 1.0g，浴槽中连续均匀地通入 O_2 小泡（约 50 个/min），蓄养液温度（32±0.5)℃，每 1000mL 蓄养液中 Ca^{2+}、Na^{+}、K^{+} 浓度分别为 0.06g、0.25g、0.28g。让子宫静置 15min，待子宫肌适应后加入缩宫素或益母草，记录子宫肌收缩，待收缩达到最高点开始松弛时停止记录，放去含有药液的蓄养液，用新的蓄养液洗涤 2 次，放去后再加入定量蓄养液，静置片刻，进行第 2 次加注药液，间隔时间每次相同，约 5min。平衡记录仪的量程为 20mV，纸速为 4mm/min。选择标准品缩宫素、鲜益母草胶囊和益母草流浸膏各高、低两个剂量（比值为 1∶0.7），做完 6 组子宫收缩记录，每组内各剂量排列次序均不同（ABCDEF、BCDEFA、CDEFAB、DEFABC、EFABCD、FABCDE、AFBCDE ……从中随选 6 组），实验要求高低剂量引起的反应高度在 20～85mm 范围内。

④ 四点法重复实验并统计结果　实验结束后，根据各次反应高度，采用平行线四点法，对每个样品重复检定 3 次，取平均值作为效价。

（5）结果　见表 4-17、表 4-18、表 4-19。

表 4-17　鲜益母草胶囊和益母草流浸膏第 1 次生物检定实验数据

组　别	鲜益母草胶囊/mL		益母草流浸膏/mL		缩宫素标准品/mL	
	高剂量 0.6	低剂量 0.42	高剂量 0.6	低剂量 0.42	高剂量 0.6	低剂量 0.42
子宫肌收缩高度(y)/mm	56	37	35	21	45	29
	69	33	59	28	67	41
	77	40	61	26	73	32
	71	36	60	31	58	33
	81	47	56	25	71	47
	68	45	57	22	61	47
总和 Y	422(T_2)	238(T_1)	328(T_2)	153(T_1)	375(S_2)	229(S_1)

表 4-18 鲜益母草胶囊四点法检定的方差分析

变异来源	自由度	均方	F	P	变异来源	自由度	均方	F	P
药品间	1	130.7	1.9	>0.05	组间	3	1576.1	23.1	<0.05
回归	1	4537.5	66.6	<0.05	误差	20	68.2		
偏离平行	1	60.2	0.9	>0.05					

表 4-19 鲜益母草胶囊和益母草流浸膏生物效价测定

检定样品	相当于标准品缩宫素的生物效价/U/g			3 次平均值	RSD
	第 1 次	第 2 次	第 3 次		
鲜益母草胶囊	0.0515	0.0497	0.0569	0.0527±0.0031"	0.059
益母草流浸膏	0.0426	0.0391	0.0463	0.0427±0.0029	0.068

注：与流浸膏相比 $P<0.05$。

【附】 根据四点法对鲜益母草胶囊实验测定数据进行分析：①药品间差异不显著（$P>0.05$），②回归间及组间差异有显著意义（$P<0.05$），③偏离平行的差异无显著意义（$P>0.05$）。即本例可靠性检验合格，可以用四点法计算效价。

鲜益母草胶囊的效价 $P_T=0.01U/mL(0.964\sim1.161)=0.00964\sim0.01161U/mL$；而每 1mL 鲜益母草胶囊液相当于 0.205g 鲜益母草药材，故鲜益母草胶囊的效价 $P_T=[(0.00964\sim0.01161)/0.205]U/g=0.0470\sim0.0566U/g$，即每 1g 药材约相当于 0.0515U 缩宫素标准品的缩宫效应，平均可信限率为 9.3%。

益母草流浸膏的效价 $P_T=[(0.00783\sim0.00961)/0.205]U/g=0.0382\sim0.0469U/g$，即每 1g 药材约相当于 0.0426U 缩宫素标准品的缩宫效应，平均可信限率为 10.2%。

3. 板蓝根

【来源】 本品为十字花科植物菘蓝（*Isatis indigotica* Fort.）的干燥根。

【效价测定】

（1）材料 菘蓝的干燥根，马蓝的根。

（2）方法

① 样品液制备（板蓝根凝集素提取） 将样品粉碎，经丙酮脱脂，分别用缓冲液［Tris-HCl(pH=7)，NaAc，HAc(pH=5)］，与样品按 5∶1（体积∶质量）浸泡过夜，冷冻离心 10min（10000r/min），取其上清液备用。

② 凝集素活性测定 用 96 孔板测定板蓝根凝集素血凝活性，每孔加入缓冲液 25μL，再取待测样品 25μL 加入第一孔，并进行倍比稀释，然后每孔加入 2%～3%兔血红细胞悬浮液 25μL，室温下 30min 后观察结果，并计算各样品的血凝活性效价。

③ 抗流感病毒测试 将不同产地、不同血凝活性的马蓝和菘蓝板蓝根凝集素样品编号待测。用鸡胚培养法测其抗病毒功效。

（3）结果 见表 4-20、表 4-21、表 4-22。

表 4-20 马蓝根凝集素血凝活性测定结果

样品号	生长地	所属省份	血凝活性效价 Tris-HCl 缓冲液(pH=7)
1	崇明县	四川	2^5
2-1		湖北	2^5
2-2		湖北	2^2
3		广东	2^3

注：2-1、2-2 为相同样品，且 2-2 在 4℃下保存一年。

表 4-21 马蓝根凝集素抗病毒作用 (1)（流感病毒 A_1/京防/97-53H_1N_1）

样品号	尿囊液平均血凝滴度		
	直接作用	治疗作用	预防作用
供试品 2-1	<1：10	1：160	1：80
病毒对照组	1：320	1：320	1：320
盐水对照组	—	—	—

注：直接作用表示直接杀死接种的病毒。治疗作用表示在病毒感染后治愈。预防作用表示可抑制病毒繁殖。

表 4-22 板蓝根凝集素抗病毒作用 (2)（流感病毒 A_1/京防/262/95）

样品号	尿囊液平均血凝滴度		
	直接作用	治疗作用	预防作用
供试品 1	1：150	1：240	1：140
供试品 2-2	<1：10	1：160	1：210
供试品 3	1：110	1：100	1：160
病毒对照组	1：200	1：200	1：200
盐水对照组	—	—	—

〖附〗 马蓝、菘蓝板蓝根存在血凝活性差异。马蓝板蓝根凝集素的血凝活性普遍比菘蓝板蓝根高。从菘蓝板蓝根中提取的凝集素几乎均无血凝活性。

血凝抑制试验方法检测板蓝根凝集素抗流感病毒的效果，经血凝素滴定，以出现卄血凝的血凝素最高稀释度为其血凝效价，即 1 个血凝单位。实验采用四个血凝单位，血凝效价 1：320（或 1：200）为一个血凝单位，4 个单位即为 1：80（或 1：50）血清抗体效价升高至 4 倍或 4 倍以上者为阳性。结果显示，板蓝根凝集素的抗病毒功效与其血凝活性的高低有关。两者呈正相关，即血凝效价愈高，抗流感病毒能力就愈强。

4. 大蒜油

〖来源〗 本品为百合科植物大蒜（*Allium sativum* L.）的乙醇提取物。

〖效价测定〗

(1) 材料 紫皮大蒜，β-环糊精（β-CD）。

(2) 仪器 JJ-2 组织破碎匀浆机。

(3) 试剂 大肠杆菌［CM-CC（B）44103］。大蒜油对照品（山东苍山县大蒜制品厂）。

（4）方法

① 大蒜油的提取　取去紫皮独蒜 1000g，用 JJ-2 组织破碎匀浆机破碎，加蒸馏水 1500mL。水蒸气蒸馏下收集馏液约 200mL，静置，分出部分油层，剩余溶液用氯仿萃取 2 次，取两次氯仿层合并，于水浴上回收氯仿。残留物与挥发油合并得大蒜油。

② 大蒜油包结物的制备　将大蒜油和各 CD 加入到饱和 45％乙醇中，水浴 70℃搅拌至无油滴，静置，滤过，取沉淀物于 40℃下干燥，得白色大蒜油粉，即大蒜油件环糊精包结物。

③ 大蒜油抗菌物质含量测定

a. 配制检定培养基和大肠杆菌增菌培养基　制备合适的菌悬液；在半无菌室完成滴样操作。

b. 制备无菌双碟　标记无菌双碟，每个无菌双碟加入溶化好的Ⅵ号培养基 20mL，让其自然凝固，作底层。将计算好的大肠杆菌菌悬液 0.05mL 加入另外 50mLⅥ号培养基中，摇匀，每个双碟加入 5mL。摇匀作菌层，备用。

c. 标准品和样品的制备　大蒜油中以大蒜辣素和大蒜新素具有抗菌作用，且油中两者的相对含量约为 77.80％。用 20％浓度的乙醇为溶剂和稀释剂，将大蒜油粉和对照品大蒜油按 1∶0.8 剂距按高、中、低计算并稀释，得相对含量分别为样品大蒜油粉为 T，则 $d_{T_1}=3.2\%$、$d_{T_2}=4.0\%$、$d_{T_3}=5.0\%$。标示量（A_T）为 76％。对照品大蒜油为 S，则 $d_{S_1}=3.2\%$、$d_{S_2}=4.0\%$、$d_{S_3}=5.0\%$。

d. 滴样和培养　在制备好的每一个双碟中以等距离均匀安置无菌钢管 6 个，间隔滴入样品和对照品高、中、低 3 剂量，盖上陶瓦盖，37℃恒温箱培养 18h，量取抑菌圈直径（Y），并进行数理统计。

④ 计算和统计结果　按《中华人民共和国药典》2005 版二部附录Ⅻ）生物检定统计法三剂量法统计结果，将培养好的双碟量取抑菌圈直径并计算抑菌结果。

（5）结果　见表 4-23、表 4-24、表 4-25。

表 4-23　大蒜油包结物抑菌结果

	d_{S_1}	d_{S_2}	d_{S_3}	d_{T_1}	d_{T_2}	d_{T_3}	$\sum y_m$
y(mm)	16.05	16.30	16.50	16.10	16.30	16.45	97.70
	16.10	16.30	16.50	16.05	16.15	16.40	97.50
	16.05	16.20	16.30	16.20	16.45	16.50	97.70
	16.30	16.40	16.45	16.20	16.35	16.60	98.30
	16.40	16.45	16.50	19.20	16.30	16.55	98.40
	16.40	16.55	16.60	16.15	16.35	16.60	98.65
	15.95	16.20	16.50	16.20	16.45	16.60	97.80
	15.90	16.35	16.45	16.15	16.35	16.50	97.70
	15.95	16.40	16.55	16.30	16.40	16.55	98.15
$\sum y(k)$	145.40 S_1	147.15 S_2	148.35 S_3	145.55 T_1	147.10 T_2	148.65 T_3	881.80

表 4-24　大蒜油包结物含量测定的可靠性检验结果

变异来源	自由度	差方和	方差	F	P
试品间	1	0.0097407	0.0097407	<1	>0.05
回归	1	1.12006944	1.12006944	112.05518	<0.01
偏离平行	1	0.000625	0.000625	<1	>0.05
二次曲线	1	0.00689815	0.00689815	<1	>0.05
反向二次曲线	1	0.00689815	0.00689815	<1	>0.05
剂间	5	1.143082	0.2286164	22.87148	<0.01
碟间	8	0.208572	0.0260715	2.60827	>0.05
误差	40	0.399828	0.0099957(S^2)		
总计	53	1.751482			

注：$F(1,40,0.05)=4.08$，$F(1,40,0.01)=7.31$。

表 4-25　大蒜包结物中主要成分的相对含量

样　　品	主要成分的相对含量/%					
	1	2	3	4	5	6
大蒜包结物(0.1g+0.5mL 甲醇)	4.52	2.41	34.9	5.32	42.67	2.48
大蒜油(9mL 油+0.5mL 甲醇)	5.13	2.55	34.10	5.60	43.76	1.54

注：1—二烯丙基·硫化物；2—甲基烯丙基二硫化物；3—二烯丙基·硫化物（大蒜辣素）；4—甲基烯丙基三硫化物；5—二烯丙基三硫化物（大蒜新素）；6—未鉴定。

〖附〗

① 数理统计分析表明，回归非常显著（$P<0.01$），偏离平行、二次曲线、反向二次曲线均不显著（$P>0.05$），实验结果成立。组内差异非常显著（$P<0.01$），分除组内差异，可以减少实验误差。各项差方和如下：

$$差方和(总)=1.751482\quad f=9\times6-1=53$$

$$差方和(剂)=1.143082\quad f=6-1=5$$

$$差方和(碟)=0.208572\quad f=9-1=8$$

$$差方和(误差):1.751482-1.43082-0.208572=0.399828$$

$$f=53-5-8=40$$

② 通过对大蒜辣素相对含量及可信限的计算得大蒜包结物中大蒜新素和大蒜辣素的相对含量为 76.26%，其可信限为 72.81%～79.88%。与文献报道的气相色谱法分析所测含量相近，说明用生物检定法测定大蒜油中抗菌物质的含量方法可行。

③ 利用 β-环糊精的分子特点，对大蒜提取物中的大蒜油进行包结，用生物方法和气相色谱法测定，得到了相似的结果，说明我们使用的工艺是可行的。

5. 洋地黄苷

〖来源〗 本品为玄参科植物洋地黄（Digitalis Purpurea L.）种子和叶中的成分。

〖效价测定〗

采用直接测定法：即比较洋地黄标准品与供试品对鸽的最小致死量，以决定供试品的效价。

（1）标准品溶液的配制　迅速精密称取洋地黄标准品适量，注意避免吸湿，置玻璃容器内。按洋地黄标准品标签上标示的单位数，每 1 个单位精密加入 76%乙醇 1mL，密塞，连续振摇 1h，静止片刻，用干燥的滤器滤过，即得。每 1mL 的溶液相当于 1 个单位。密塞，置冷藏器内保存（出现沉淀或储存超过 1 个月，即不宜用）。

（2）标准品稀释液的配制　于试验的当日，精密称取标准品溶液一定量，用生理盐水稀释。稀释倍数应调节适当（通常约为 3.3%），使鸽的平均最小千克致死量在 25～34mL 之间。

（3）供试品溶液和稀释液的配制　供试品如为粉末，可精密称取适量，照上述标准品溶液及其稀释液的配制方法配制；供试品如为片剂，可取若干片，精密称重（求出平均片重），迅速研细再精密称取不少于 20 片的粉末，根据称重折算，按上述标准品溶液及其稀释液配制的方法配制。

（4）检定方法　取体重 250～400g 的健康无伤的鸽，于试验前 16～24h 移去饲料，但仍给予饮水，临试验前称重，选出至少 12 只，各鸽间体重相差不得超过 100g。将鸽分成 2 组，每组至少 6 只，一组为标准品组，一组为供试品组。2 组间鸽的一切情况应尽可能相近。

用标准品或检品稀释液淋洗滴定管（滴定管最小刻度以 0.02mL 为宜），并充满之，连接橡皮管，装上弯针头，并将药液放至 0 点刻度，注意整个管内及针头内不得留有气泡。取鸽用棉花一薄层包裹鸽的喙部在棉花上滴加乙醚麻醉至鸽不再挣扎。称重后，将鸽仰缚于鸽板上，继续滴加乙醚，使鸽麻醉至痛觉消失、呼吸均匀、而角膜反射尚存，并在整个实验过程中，随时滴加乙醚以维持恒定的麻醉状态，拔去鸽翼内侧翼静脉部位的羽毛少许。用眼科小镊子夹起翼静脉部位的表皮和结缔组织，小心剪去，裸露出明显的翼静脉 1cm，手术部位不要过大，以免出血过多而使翼静脉瘪下，随即将鸽板靠近滴定管，使弯针头平行地轻靠在裸露的翼静脉上。在翼静脉较直的一段进行注射，以拇指和食指捏住针头柄，以中指抵住针头弯曲处，插入静脉中平行地向前推进，以免扎破静脉，勿将针尖口放置于静脉的分支处，以免因血凝固将其堵塞。立即注入药液 0.5mL，观察药液的注入，必须通畅而不漏出静脉外，同时按下停表，记录其注入开始的时间，然后调节药液的注入速度为每分钟 0.2mL，直至鸽中毒死亡，即为实验的终点。注入药液可用注射针头与最小刻度为 0.02mL 的滴定管相连。中毒死亡之前可有颤抖、恶心、呕吐、瞳孔放大、排便、呼吸停止等现象发生。记录注入药液的总量，换算成体重每千克所需药物的毫升数，即为该鸽每千克的致死量。

按下列公式算出稀释液 1mL 中含有的洋地黄单位数。

$$1\text{mL 稀释液含有洋地黄单位数}=(a\times F)/b$$

式中 a——标准品稀释液的平均每千克致死量；

b——检品稀释液的平均每千克致死量；

F——标准品稀释液的效价单位 U/mL。

然后再按检品的稀释数，算出检品所含的单位数。或按下法计算：

$$\text{供试品溶液 1mL 中含有洋地黄单位数}=\lg^{-1}(X_S-X_T)$$

式中 X_S——标准品组每千克致死量的对数平均值；

X_T——供试品组每千克致死量的对数平均值。

然后，再按检品的稀释倍数，算出供试品的效价或相当于标示量的百分数。计算方法亦可按照《中华人民共和国药典》2005 版附录XIV生物检定法中的直接测定法计算。本法可信限率不得大于 15%。

（5）结果 见表 4-26、表 4-27。

表 4-26 标准品组效价测定结果

编号	鸽重/g	稀释液致死量/mL	稀释液最小致死量/mL·kg^{-1}	原溶液最小致死量/mL·kg^{-1}	原溶液最小致死量的对数(X_S+1)
1	309	10.64	34.43	1.1443	1.0585
2	291	8.80	30.24	1.0080	1.0035
3	337	11.14	33.06	1.1020	1.0422
4	291	9.92	34.09	1.1363	1.0555
5	305	9.68	31.74	1.0580	1.0245
6	292	8.31	28.46	0.9487	0.9771
7	307	9.74	31.73	1.0577	1.0244

$\Sigma(X_S+1)=7.1857,(\overline{X_S+1})=1.0265,$

$\Sigma(X_S+1)^2=7.3814$

表 4-27 供试品组效价测定结果

编号	鸽重/g	稀释液致死量/mL	稀释液最小致死量/mL·kg^{-1}	原溶液最小致死量/mL·kg^{-1}	原溶液最小致死量的对数(x_T+1)
1	305	10.35	33.93	1.301	1.0535
2	307	10.24	33.36	1.1120	1.0461
3	312	9.56	30.64	1.0213	1.0016
4	282	8.68	30.78	1.0260	1.0112
5	285	8.76	30.74	1.0247	1.0106
6	315	9.48	30.10	1.0033	1.0043
7	285	9.26	32.49	1.0830	1.0346

$\Sigma(X_T+1)=7.1619,(\overline{X_T+1})=1.0231$

$\Sigma(X_T+1)^2=7.3302$

【附】 计算：

供试品溶液 1mL 含有的洋地黄单位数＝$1g^{-1}(1.0265-1.0231)=1.008U$

供试品 1g 含有的洋地黄单位数＝$1.008\times10=10.08U$

平均可信限率计算：

$$平均可信限率=S_{\overline{x}_S-\overline{x}_T}\times2.3\times t\times100\%$$

$$S_{\overline{x}_S-\overline{x}_T}=\frac{\sqrt{(n_s+n_T)s^2}}{n_s\cdot n_T}$$

$$s^2=\frac{\sum_{x_S^2-x_S}\cdot\sum_{\overline{x}_S}\sum_{x_T^2-x_T}\cdot\sum_{\overline{x}_T}}{f}$$

$$f=n_s+n_T-2$$

式中 $S_{\overline{x}_S-\overline{x}_T}$——标准误差；

s^2——误差项的变异数；

x_s——标准品组对数最小致死量；

x_T——供试品组对数最小致死量；

n_s——标准品组动物数；

n_T——供试品组动物数；

f——自由度。

实例平均可信限率计算：

$$s^2=\frac{7.3814-1.0265\times7.1857+7.3302-1.023\times7.1619}{7+7-2}=0.00068$$

$$S_{\overline{x}_S-\overline{x}_T}=\frac{\sqrt{(7+7)\times0.00068}}{7\times7}=\sqrt{0.0001943}$$

$$=0.0138$$

$$f=7+7-2=12 \qquad t=2.18(P=0.95)$$

平均可信限率＝$0.0138\times2.3\times2.18\times100\%=6.92\%$

即平均可信限率在 15％以下。

6. 类凝血酶

【来源】 为蝮蛇毒制品。

【效价测定】

（1）材料 类凝血酶［thrombin like cnzymc（TLE）］原料及其制剂。

（2）仪器与试剂 电动搅拌器，654-pH 仪（Metrohm 公司）。

（3）试剂 类凝血酶对照品（国家暂行标准品），纤维蛋白原（国家标准试剂），氯化钠、盐酸、氢氧化钠、三羟甲基氨基甲烷（Tris）。Tris-HCl 缓冲液（0.04mol/L，pH7.4）：称取 Tris2.42g，氯化钠 0.585g，置烧杯中加水适量溶解，用盐酸调 pH 为 7.4，加水至 500mL。0.4％纤维蛋白原液：取纤维蛋白原 1 支，用 Tris-HCl 液配成 0.4％可凝蛋白溶液。

(4) 方法

① 标准曲线的制备　取对照品适量，加入 Tris-HCl 缓冲液，分别配成每毫升含 20U、10U、5U、2.5U 浓度的对照液。取内径 1cm、长 10cm 的试管 9 支，各精密加入纤维蛋白原液 0.2mL，(37±0.5)℃水浴中保温 2min，再分别精密量取 9 种浓度的对照品液各 0.2mL，迅速加入上述各管中，摇匀，记时，于 (37±0.5)℃水浴中观察纤维蛋白的初凝时间，在双对数坐标纸上以每管中对照品的单位数 (U) 为横坐标，凝结时间 (T) 为纵坐标绘制标准曲线。

② 供试品测定　取供试品适量，加入 Tris-HCl 缓冲液配成标准曲线范围内的溶液，按上述对照品方法操作，每次平行测定 5 次，取其平均值的对数值，在标准曲线上或用直线回归方程求单位数。

(5) 结果　对 30 多个厂家的原料与制剂进行了测定，部分结果统计见表 4-28。不同离子浓度的缓冲液对标准曲线的影响用 0.15mol/L、0.10mol/L、0.04mol/L 3 种不同离子浓度的缓冲液对标准曲线进行摸索，结果见图 4-2。

表 4-28　类凝血酶原料及其制剂测定结果

原料	效价/U·mg^{-1}					$\overline{X}$	RSD/%	制剂	效价/U·支$^{-1}$					$\overline{X}$	RSD/%
1	1170	1170	1105	1105	1170	1144	3.10	1	9.7	9.7	9.6	9.7	9.9	9.72	1.13
2	1321	1241	1321	1241	1321	1289	3.40	2	10.2	10.2	10.2	10.4	10.2	10.24	0.87
3	1284	1284	1321	1257	1284	1284	1.52	3	11.3	11.7	11.3	11.3	11.3	11.38	1.57
4	1437	1437	1409	1409	1437	1426	1.08	4	10.7	10.7	10.7	10.7	10.2	10.60	2.10
5	1424	1424	1463	1424	1477	1442	1.78	5	10.2	10.2	10.2	10.2	10.7	10.30	2.20

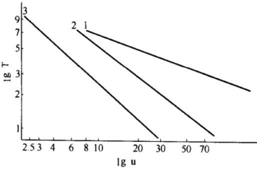


图 4-2　不同离子浓度绘制的标准曲线

1—0.15mol/L 缓冲液系统；2—0.10mol/L 缓冲液系统；3—0.04mol/L 缓冲液系统

【附】

① 精密度测定　取样品 3 批，每批测定 5 次，样品 1、2、3 的 RSD 分别为 1.23%、0.87%、0.76%。说明结果稳定。

② 回收率测定　分别吸取浓度为 20mol/L、10mol/L、5mol/mL 的标准液

2mL 加入各空白冻干基质中测定其平均回收率（$n=3$）为 100.20%、101.00%、99.00%，证明此测定方法可靠。

③ 干扰实验　按制剂要求，另取空白制剂基质冻干成样品支架，参照样品测定，结果无任何凝结反应，表明基质不干扰测定。

0.15mol/L、0.10mol/L、0.04mol/L 的缓冲系统斜率值分别为：0.3696、0.8302、0.9362。0.15mol/L 缓冲系统的浓度范围为 60～15U/mL，时间为 32～55s。0.10mol/L 的浓度范围为 60～10U/mL，时间为 7～31s；0.04mol/L 的浓度范围为 20～2.5U/mL，时间为 7～54s。

7. 蚓激酶

〖来源〗 本品是从蚯蚓（*Eisenia foetida* Savigny）提取得到的酶，为康脂口服液的主要原料。

〖效价测定〗

（1）材料　康脂口服液（批号：990801、990802、990803、990806、990901）。

（2）仪器　723 型紫外光谱分光光度仪。

（3）试剂

① 磷酸盐缓冲液（0.1mol/L）　a. 称取 $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ 35.82g，加水至 1000mL。b. 称取 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 15.60g，加水至 1000mL。取 a 液与 b 液混合，调节 pH 至 8.0。

② 15%三氯醋酸液　称取三氯醋酸 15.0g，加水稀释至 100mL。

③ 2%高锰酸钾液　称取高锰酸钾 2.0g，加水稀释至 100mL。

④ 10%无水亚硫酸钠液　称取无水亚硫酸钠 1.0g，加水稀释至 100mL（临时配制）。

⑤ 0.4%变色酸硫酸液　称取变色酸 0.4g，加 67%硫酸（质量与质量比）至 100mL（临时配制）。

⑥ 标准甲醇液　精密量取甲醇 0.102mL，置 25mL 容量瓶中，加入磷酸盐缓冲液（0.1mol/L）至刻度，摇均。精密量取此液 0.2mL，置 5mL 容量瓶中，用磷酸盐缓冲液（0.1mol/L）稀释至刻度。

（4）方法

① 供试品溶液的制备　精密吸取样品康脂口服液 0.32mL（相当于 0.032g 样品量），置 100mL 容量瓶中，用磷酸盐缓冲液（0.1mol/L）稀释至刻度。

② 标准曲线的制备　取试管 12 支，分为 2 组，每组分别加入磷酸缓冲液 0.30mL、0.25mL、0.20mL、0.15mL、0.10mL、0.05mL，空白管不加，其余各管依次加入标准甲醇液 0.05mL、0.10mL、0.15mL、0.20mL、0.25mL，各管加入 15%三氯醋酸 0.2mL、2%高锰酸钾 0.1mL，振摇 90s，各管再依次加入 10%无水亚硫酸钠 0.1mL，变色酸 4.0mL，放入沸水浴中煮沸 25min，取出置

冷水浴中 15min，按分光光度法在 580nm 处测定吸光度，以甲醇浓度为横坐标，以吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

③ 样品测定 取具塞试管 6 支，2 支空白管，4 支样品管，于各管加入 TAME 0.1mL，磷酸盐缓冲液（0.1mol/L）0.1mL，于空白管中加入 15%三氯醋酸 0.2mL，其他各管加入供试品液 0.1mL，于 37℃水浴 40min，取出后，空白管加供试品液 0.1mL，样品管加 15%三氯醋酸 0.2mL，以下步骤同标准曲线。

④ 效价计算 根据测定的样品吸光度值，在标准曲线上查出甲醇的量，依照下列公式计算供试品中的 TAME（对甲苯磺酰 2L2 精氨酸甲酯法）单位效价。

（5）结果

TAME（U/mL）=甲醇 mol 数（微克分子数）样品量（mL）×时间（min）

$$\text{TAME (U/mL)} = \frac{\text{甲醇的物质的量}}{\text{样品量 (mL)} \times \text{时间 (min)}}$$

① 单位效价的测定 5 批样品 TAME 单位效价的测定结果为 1.96U/mL、2.09U/mL、2.12U/mL、2.06U/mL、1.92U/mL，平均值 X 为 2.01，相对标准差 *RSD* 为 4.9%，可见其效价单位均在 1.5U/mL 以上。在不影响产品疗效前提下，将产品中酶单位效价限度定为每毫升不少于 1.0 个单位。

② 稳定性实验 同一供试品液（样品批号为 990901）间隔 15min 测定 1 次，测定 5 次，结果分别为 1.92、1.92、1.91、1.92、1.92。结果表明样品具有良好的稳定性。

③ 重现性实验 同一批样品（样品批号为 990901）依照上述方法进行 5 次测定，结果为：1.92、1.93、1.89、1.91、1.92，其 TAME（U/mL）平均值 X 为 1.92，相对标准差 *RSD* 仅为 0.8%。即该方法测定康脂口服液中蚓激酶单位效价精密度较高，重现性好。

8. 鲑鱼降钙素

【来源】 本品为鲑鱼直链多肽。

【效价测定】

（1）实验动物 SD 大白鼠，雄性，50～90g，每次实验体重范围不超过 10g。

（2）仪器与试剂 原子吸收分光光度计。

（3）试剂 降钙素标准品（100U/mL，Sandoz），降钙素供试品（合成鲑鱼降钙素），鲑鱼降钙素鼻腔喷雾剂（550U/mL，Sandoz），鲑鱼降钙素注射液（50U/mL，Sandoz）。标准钙溶液（1.0mg/1.0mL）。

（4）方法

① 样品液制备 实验当日，用 0.1%牛血清白蛋白溶液（pH=3.8～4.2）将 S 和 T 配制并稀释成 2～3 组适当浓度的稀释液（mU/mL），剂距 γ 为 1∶3。

② 实验动物含钙血清制备 用中国药典（3.3）或（2.2）量反应平行线测

定法。大鼠实验前禁食 19～21h，但给饮蒸馏水。实验当日，大鼠随机分组、随机静脉注射 S、T 各组稀释液，每鼠 0.4mL，1h 后用 25%乌拉坦溶液 4mL/kg 麻醉，自眶静脉取血约 1mL，立即制备分离血清，4℃储存。24～48h 后，取出血清，测血清钙含量，以 μg/mL 表示。

③ 血清钙测定　用原子吸收分光光度法。日立 180/80 型仪器的标准曲线浓度取 3 点，标准曲线的相关系数大于 0.9950，血清不去蛋白质，每管测 2 次，取平均值，必要时，测 20 管后重新标定标准曲线。

(5) 结果　见表 4-29。

表 4-29　降钙素大鼠降血钙法效价测定结果

项　　目	S		T		空白对照
	d_{S_1}	d_{S_2}	d_{T_2}	d_{T_1}	
每只大鼠剂量/mU	6.0	18.0	6.0	18.0	溶剂
lg(X)	0.7782	1.2553	0.7782	1.2553	
反应 (Y)/μg. mL⁻¹	94.10 86.55 85.90 93.55 88.75	78.50 68.30 66.15 71.81 74.30	93.80 84.20 93.85 76.45 86.80	77.75 77.80 71.25 74.55 69.80	106.70 101.45 96.05 108.15 116.65
Y(K)	89.77	71.81	87.02	74.23	105.80

注：1. 可靠性测验，符合中国药典（1990）。

2. A_T=50U/mL，R=0.984，P_T=50.6U/mL，FL%=37.74%。

禁食大鼠（8 只），血清钙浓度平均为（97.18±5.2）μg/mL，变异系数 11%；未禁食鼠（8 只）为（124.97±14.83），变异系数 15%。两者有非常显著的差异（$P<0.01$）。8 只大鼠血清钙量为（125±15）μg/mL。

大鼠经采血后在 4℃储存 24～48h 再制备血清测得的钙浓度为 90.15μg/mL，而用 BP 方法采血后立即制备血浆测得的钙浓度为 91.77，两者无显著差异（$P>0.05$）。

【附】 采血后在 4℃储存 24～48h 再制备血清测钙，与采血立即制备血浆测钙比较，测得结果没有差别，但制备血清较为方便，不加抗凝剂可减少干扰因素；4℃储存 48h，操作时间的掌握较为方便、灵活，故实验的成功率高。

大鼠禁食前后，血清钙浓度有差别，禁食后血清钙较低，但较稳定，变异较小。取血清量为 0.2mL 的回收率比较好，而且需血量少（1mL），从眶静脉取血就能满足需要，可以不必按 BP 要求自胸腔内采血。降钙素的生物检定只要严格掌握实验条件，动物分组及给药次序用随机方法准确地在给药后（60±0.5）min 取血，实验的成功率比较高。

参 考 文 献

1 杨明华，杨苏蓓等. 益母草药材生物检定方法的研究（Ⅱ）——缩宫素、益母草量效关系和检定适用效应模式的建立. 中草药［J］，2002，25（6）：409～411

2 杨明华，王溶溶. 益母草药材生物检定方法的研究（Ⅲ）——鲜益母草胶囊和益母草流浸膏生物，效价与临床疗效的相关性观察. 中国现代应用药学杂志［J］. 2004，21（2）：124～126

3 胡兴昌，程佳蔚. 板蓝根凝集素效价与抑制感冒病毒作用关系的实验研究. 上海中医药大学学报［J］. 2001，15（3）：56～57

4 郝苏丽，沈佳等. 类凝血酶效价测定方法的研究. 中国生化药物杂志［J］. 1997，18（3）：134～136

5 李剑梅，苗玉琨等. TAME 法对康脂口服液中蚓激酶单位效价的测定. 微生物学杂志［J］. 2001，21（3）：61～62

6 陈钢，唐黎明. 鲑鱼降钙素生物测定方法的研究. 西北药学杂志［J］. 1993，8（4）：149～151

7 周重阳，陈海波等。用生物检定法测定大蒜油中大蒜辣素和大蒜新素的含量，中草药［J］. 1997，28（1）：18～20

（李仁伟，王奕洁，张贵君）

第五章　单纯指标鉴定法

第一节　概　　述

单纯指标测定法就是测定某药物或其化学组分的某一生物特性或某一药理作用的强弱，用以鉴别中药的品质的一种方法。

中药作为防病治病和卫生保健的药物，它们都具有特定的生物活性，对生物体或离体的器官组织能产生一定的生物效应，在临床上表现为药理作用如溶血、凝血、抗癌、免疫调节、降压、降血脂等。通过对中药特征性药理作用指标的检测，能有效判别它们的品质优劣，同时为临床用药提供实用的参考数据。

中药纯指标的测定不但涉及到各种生物学技术，还必须参考和借鉴药理学实验的方法和手段。特别是对中药效应指标的测定，实验方法的设计和效应指标的选择尤为重要。它既不同于效价的测定，也有别于中药特定成分的生物学特异性分析。从实验材料的选定到实验方法的建立，药理实验模型都是我们必须参考的重要内容。效应指标应尽可能地反映中药的临床功效，将中药品质的评价与临床结合起来。

在中药纯指标鉴定方面，如对含皂苷类中药溶血指数的测定，曾用于鉴定柴胡和大叶柴胡；对大黄的泻下作用的测定；对青黛中靛玉红、两头尖中竹节香附素 A 的抗癌活性的测定；对黄芪中黄芪皂苷甲、三七中三七皂苷降血压和扩张血管作用的测定；对人参中人参多糖，刺五加根中刺五加多糖和红花多糖的免疫作用的测定；对三七抗凝血作用的测定等。这些指标的检测，都能从临床实践角度反映中药的品质，是中药品质评价的重要内容。

第二节　单纯指标的测定方法

一、黏稠度的测定

黏稠度系指流体对流动的阻抗能力，采用动力黏度、运动黏度或特性黏度表示之。测定液体药品或药品溶液的动度可以鉴定或检查其纯度。

流体分牛顿流体和非牛顿流体两类。牛顿流体流动时所需剪应力不随流速的改变而改变，纯液体和低分子物质的溶液属于此类；非牛顿流体流动时所需剪应

力随流速的改变而改变，高聚物的溶液、混悬液、乳剂分散液体和表面活性剂的溶液属于此类。

黏度的测定可用黏度计。黏度计有多种类型，如毛细管式和旋转式黏度计。毛细管黏度计因不能调节线速度，不便测定非牛顿流体的黏度，但对高聚物的稀薄溶液或低黏度液体的黏度测定影响不大；旋转式黏度计适用于非牛顿流体的黏度测定。

液体以 1cm/s 的速度流动时，在每 $1cm^2$ 平面上所需剪应力的大小，称为动力黏度，以 Pa·s 为单位。在相同温度下，液体的动力黏度与其密度的比值，再乘 10^6，即得该液体的运动黏度，以 mm^2/s 为单位。用在规定条件下测定供试品在平氏黏度计中的流出时间（s），与该黏度计用已知黏度的标准液测得的黏度计常数（mm^2/s^2）相乘，即得供试品的运动黏度。

溶剂的黏度 η_0 常因高聚物的溶入而增大，溶液的黏度 η 与溶剂的黏度 η_0 的比值（η/η_0）称为相对黏度（η_r），常用在乌氏黏度计中的流出时间的比值（T/T_0）来表示。当高聚物溶液的浓度较稀时，其相对黏度的对数值与高聚物溶液浓度的比值，即为该高聚物的特性黏数（η）。根据高聚物的特性黏数可以计算其平均分子量。

1. 仪器用具

（1）恒温水浴　可选用直径 30cm 以上、高 40cm 以上的玻璃缸或有机玻璃缸，附有电动搅拌器与电热装置，供测定运动黏度时应能恒温±0.1℃，供测定特性黏数时应能恒温±0.05℃。

（2）温度计　分度为 0.1℃。

（3）秒表　分度为 0.2s。

（4）平氏黏度计（图 5-1）　可根据需要分别选用毛细管内径为 0.8mm±0.05mm、1.0mm±0.05mm、1.2mm±0.05mm、1.5mm+0.1mm 或 2.0mm±0.1mm 的平氏黏度计。

（5）旋转式黏度计。

（6）乌氏黏度计（图 5-2）　除另有规定外，毛细管 E 内径为 0.5mm±0.05mm，长 140mm±5mm；测定球 A 的容量为 3.5mL+0.5mL（选用流出时间在 120～180s 之间为宜）。

2. 测定方法

（1）第一法　用平氏黏度计测定运动黏度或动力黏度。照各药品项下的规定，取毛细管内径符合要求的平氏黏度计 1 支，在支管 F 上连接一橡皮管，用手指堵住管口 2，倒置黏度计，将管口 1 插入供试品（或供试溶液，下同）中，自橡皮管的另一端抽气，使供试品充满球 C 与 A 并达到测定线 m_2 处，提出黏度计并迅速倒转，抹去黏附于管外的供试品，取下橡皮管使连接于管口 1 上，将黏

度计垂直固定于恒温水浴中，并使水浴的液面高于球 C 的中部，放置 15min 后，自橡皮管的另一端抽气，使供试品充满球 A 并超过测定线 m_1；开放橡皮管口，使供试品在管内自然下落，用秒表准确记录液面自测定线 m_1 下降至测定线 m_2 处的流出时间。依法重复测定 3 次以上，每次测定值与平均值的差值不得超过平均值的±5%。另取一份供试品同样操作，并重复测定 3 次以上。以先后两次取样测得的总平均值按下式计算，即为供试品的运动黏度或供试溶液的动力黏度。

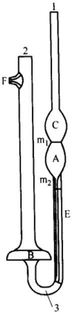


图 5-1　平氏黏度计

1—主管；2—宽管；3—弯管；
A—测定球；B—储器；C—缓冲球；
E—毛细管；F—支管；
m_1，m_2—环形测定线

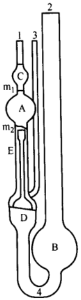


图 5-2　乌氏黏度计

1—主管；2—宽管；3—侧管；4—弯管；
A—测定球；B—储器；C—缓冲球；
D—悬挂水平储器；E—毛细管；
m_1，m_2—环形测定线

$$运动黏度\ (mm^2/s) = Kt$$

$$动力黏度\ (Pa \cdot s) = 10^6 Kt\rho$$

式中　K——用已知黏度的标准液测得的黏度计常数，mm^2/s^2；

t——测得的平均流出时间，s；

ρ——供试溶液在相同温度下的密度，kg/m^3。

（2）第二法　用旋转式黏度计测定动力黏度。

照各药品项下的规定，按照仪器说明书操作，并按下式计算供试品的动力黏度。

$$动力黏度\ (Pa \cdot s) = K'a$$

式中　K'——用已知黏度的标准液测得的旋转式黏度计常数；

　　a——偏转角。

（3）第三法　用乌氏黏度计测定特性黏数。取供试品，照各品种项下的规定制成一定浓度的溶液，用3号垂熔玻璃漏斗滤过，弃去初滤液（约1mL），取续滤液（不得少于7mL）沿洁净、干燥乌氏黏度计的管2内壁注入B中，将黏度计垂直固定于恒温水浴（水浴温度除另有规定外，应为25℃±0.05℃）中，并使水浴的液面高于球C，放置15min后，将管口1、3各接一乳胶管，夹住管口3的胶管，自管口1处抽气，使供试品溶液的液面缓缓升高至球C的中部，先开放管口3，再开放管口1，使供试品溶液在管内自然下落，用秒表准确记录液面自测定线 m_1 下降至测定线 m_2 处的流出时间，重复测定两次，两次测定值相差不得超过0.1秒，取两次的平均值为供试液的流出时间（T）。取经3号垂熔玻璃漏斗滤过的溶剂同样操作，重复测定两次，两次测定值应相同，为溶剂的流出时间（T_0）。按下式计算特性黏数（η）。

$$\eta=\frac{\ln\eta_r}{c}, \quad \eta_r=\frac{T}{T_0}$$

式中　c——供试液的浓度，g/mL。

二、溶血指数的测定

溶血指数的测定是利用中药含有皂苷的水溶液能溶解红细胞的性质，可测其溶血指数作为鉴定指标。若有标准皂苷同时进行比较，则更有意义。进行溶血指数测定时，应说明温度和应用何种动物的血，以能产生溶血的最低浓度表示之。但由于此种溶血指数受动物特异性、生理状态以及放置温度、时间等方面影响极大，因此重复性较差。

三、等电点的测定

等电点是蛋白质和氨基酸的一种特有的常数。等电点的测定是利用中药中含有的特殊蛋白质和氨基酸的性质，测其等电点作为鉴定的指标。

氨基酸是两性电解质，在水溶液中呈两性离子或偶极离子。中性氨基酸在同一分子中带有正负两种电荷，整个分子是电中性，分子中的氨基和羧基形成内盐，这种内盐在非极性溶剂中溶解度低，与酸或碱都可以形成盐类。各种氨基酸均有确定的等电点：中性氨基酸的等电点在pH＝4.8～6.3之间，酸性氨基酸的等电点在pH＝2.7～3.2之间，碱性氨基酸的等电点在pH＝7.6～10.8之间。

蛋白质和氨基酸一样，分子中既有羧基又有氨基，所以亦呈两性反应。当蛋白质溶液调节到一定的pH值时，蛋白质分子内的正负电荷数量可以完全相等，因而其分子就不会再因电场的影响而移动，此种特定的pH值，称为蛋白质的等

电点。蛋白质的等电点是随分子中氨基和羧基的数量及相对的离子化程度而定。其pH值可能大于7，也可能小于7。如果溶液的pH值小于等电点时，蛋白质即呈酸性而带正电荷；如果溶液的pH值大于等电点时，蛋白质即呈碱性电离而带负电荷。等电点和蛋白质有密切关系。

四、氨基酸的测定

氨基酸的测定是利用中药中含有的特殊氨基酸的性质，测其含量或物理、化学性质，作为其鉴定的指标。

氨基酸普遍存在于生物药中，是蛋白质的组成单位，也是有机体的主要成分之一。氨基酸分为蛋白质组分氨基酸和非蛋白质组分氨基酸两大类，前者是由蛋白质水解而来，目前认为这类氨基酸有20种，都是α-氨基酸；后者以游离的形式存在于中药中，常有明显的药理作用，如γ-氨基丁酸等。由于氨基酸的种类、数目和排列顺序等的不同，形成了千千万万种蛋白质，所以氨基酸在中药基原鉴定中具有重要价值。非蛋白质氨基酸是直接由基因作用产生的，而且相当稳定；很多非蛋白质氨基酸是可溶性氮化物的运输和储藏形式，由于结构比较简单，测定不太困难。所以不管是从生化学方面还是分类学的角度，用氨基酸来鉴定中药均具有重大意义。

第三节　常用中药鉴定举例

一、黏稠度的测定

1. 蛤蚧

〖来源〗 本品为壁虎科动物蛤蚧（*Gekko gecko* Linnaeus）的干燥体。

〖蛋白黏度测定〗

（1）材料　蛤蚧、壁虎（*G. chinensis* Gray）、多疣壁虎（*G. japonicus* Cdumeril et Bibron）、红瘰疣螈（*Tylototriton verrucosus* Anderson）、西藏沙蜥（*Phrynocephalus theobaldi* Blytn）的全体。

（2）仪器　LIANG-100型微机显示自动记录血液血浆黏度计，WMZK-01温度指示控制仪。

（3）方法

① 样品溶液的制备　精密称取样品粉末适量，用乙醇脱脂后，药渣精密加入生理盐水适量，超声波流水提取3h，离心45min（3000r/min），取上清液备用。

② 蛋白黏度的测定　用黏度计测定，恒温水浴25℃，电极为四极，以生理

盐水为参比，蛋白黏度表示为样品液流出毛细管所需的时间与生理盐水流出的时间之比值（T_s/T_r）。

③ 蛤蚧浓度与其相应的蛋白黏度的关系及统计处理　选用 2.5%、5%、10%、15%的样品浓度，依法测定各样品浓度的蛋白黏度及求出直线回归的相关系数，并作统计处理。

（4）结果　见表 5-1、表 5-2、表 5-3。

表 5-1　蛤蚧浓度与相应的蛋白黏度的关系

样品浓度/%	n	蛋白黏度($\overline{X}$)	cv/%	可　信　限
2.5	4	1.04	1.21	1.04±0.020
5		1.13	0.72	1.13±0.013
10		1.40	0.68	1.40±0.015
15		1.64	0.31	1.64±0.008
r	4	相关系数 r①=0.9987		

① 查 r 检验表（$v=2$，$P=0.01$）$r=0.990$。

表 5-2　蛤蚧等的蛋白黏度（$n=4$）

样　品	蛋白黏度($\overline{X}$)	cv/%	可信限	样　品	蛋白黏度($\overline{X}$)	cv/%	可信限
蛤蚧	1.40	0.68	1.40±0.015	红瘰疣螈	1.03	0	1.03±0
壁虎	1.07	1.32	1.07±0.023	西藏沙蜥	1.17	0.70	1.17±0.013
多疣壁虎	1.21	0.48	1.21±0.009				

表 5-3　蛤蚧等蛋白黏度的显著性检测（$n=4$）

样　品	蛋白黏度	t 样	t 查表	显著性测验结论
蛤蚧	1.40			
壁虎	1.07	41.77	3.71	$P<0.01$
多疣壁虎	1.21	42.22	3.71	$P<0.01$
红瘰疣螈	1.03	148.0	3.71	$P<0.01$
西藏沙蜥	1.17	260	3.71	$P<0.01$

〖附〗 样品浓度在 2.5%～15%范围内与其相应的蛋白黏度成线性关系，其相关系数为 0.9987。测定蛤蚧，其供试品的浓度选择 10%最佳，其实验误差 $RSD<1.5\%$。蛤价与其他伪品的蛋白黏度有非常显著性差异（$P<0.01$）。

2. 乌梢蛇

〖来源〗 本品为游蛇科动物乌梢蛇［*Zaocys dhumnades*（Cantor)］的干燥体。

〖蛋白黏度测定〗

（1）材料　乌梢蛇、三索锦蛇（*Elaphe radiata* Schlegel）、大白花蛇（*Bungarus multicinctus* Blyth）（成蛇）、红点锦蛇（*E. rufodorsata* Cantor）、王

锦蛇（*E. carinata* Gunther）、蕲蛇（*Agkistrodon acutus* Guenther）、金钱白花蛇（*B. multicinctus* Blyth）（幼蛇）的全体。

（2）仪器　LIANG-100 型微机显示自动记录血液血浆黏度计，WMZK-01 温度指示控制仪。

（3）方法

① 样品的制备　精密称取样品粗粉适量，于具塞锥形瓶中，用乙醇脱脂，药渣挥干后，精密加入生理盐水适量，置超声波提取器中流水振荡提取 3h，离心 45min（3000r/min），取上清液备用。

② 蛋白黏度的测定　用黏度计测定，恒温水浴 25℃，电极选择为 4 极，以生理盐水为参比，蛋白黏度表示为样品液流出毛细管所需的时间与生理盐水流出的时间之比值（T_s/T_r）。

③ 样品浓度与其相应蛋白黏度的相关性及数据分析　选用 5%、10%、15%、20%的样品浓度，对 6 种样品依法进行了各浓度的蛋白黏度测定；并作统计处理及求出直线回归的相关系数。

（4）结果　见表 5-4、表 5-5。

表 5-4　样品浓度与相应蛋白黏度的关系（$n=4$）

样　品	浓度/%	蛋白黏度	*RSD*/%	相关系数	样　品	浓度/%	蛋白黏度	*RSD*/%	相关系数
乌梢蛇	5	1.08	0.46	0.9903	红点锦蛇	5	1.10	1.72	0.9981
	10	1.18	0.46			10	1.23	1.43	
	15	1.40	1.22			15	1.36	0.83	
	20	1.53	1.36			20	1.50	1.76	
三索锦蛇	5	1.09	0.92	0.9936	王锦蛇	5	1.19	0.81	0.9951
	10	1.26	0.76			10	1.62	0.78	
	15	1.49	1.93			15	2.19	0.23	
	20	1.61	1.34			20	2.87	0.75	
大白花蛇	6	1.13	0.72	0.9844	蕲蛇	5	1.03	0.93	0.9873
	10	1.27	0.46			10	1.06	1.33	
	15	1.32	0.38			15	1.13	1.33	
	20	1.47	0.96			20	1.22	1.49	

表 5-5　乌梢蛇等的蛋白黏度测定结果（$n=6$）

样　品	蛋白黏度	*RSD*/%	样　品	蛋白黏度	*RSD*/%
乌梢蛇	1.18	0.99	王锦蛇	1.62	0.72
三索锦蛇	1.26	0.96	蕲蛇	1.07	0.96
大白花蛇	1.27	1.47	金钱白花蛇	1.04	1.46
红点锦蛇	1.23	1.49			

【附】 6种样品的浓度在 5%～20%时，与相应的蛋白黏度成线性关系；10%的样品浓度既能便于样品提取，又能明显反映出黏度差异，其实验误差 *RSD*<

1.5%。乌梢蛇与其他6种蛇的蛋白黏度比较有非常显著性意义（$P<0.01$）。

3. 当归

【来源】 本品为伞形科植物当归（*Angelica sinensis* Oliv.）的根。

【降低血液黏度测定】

（1）材料 当归（全归，归头，归腿），人参（移山参，生晒参）。

实验动物 Wistar大鼠，50只，雌雄各半，体重（186.67+22.67）g，由重庆医科大学实验动物中心提供。

（2）仪器 低剪切流变仪（Low shear-30，日本）等。

（3）方法

① 供试液的配制 称取样品适量，按不同规格分别打成粗粉，加水适量煎煮两次，每次30min，合并滤液，浓缩至体积。试液中每1mL含样品1g。另制备2%羧甲基纤维素钠溶液作为空白对照液。

② 动物处理及样本采集

a. 体内用药实验 取大鼠，称重，随机分组，按10g/kg剂量灌胃给药5天，每天一次。末次给药1h后，以戊巴比妥钠40mg/kg腹腔注射麻醉，腹主动脉取血，将血样沿EDTA抗凝化处理的试管壁缓慢注入试管中，然后用手握住试管中部搓动，使血液和抗凝剂充分混匀，不得凝血。血样在1h内完成测定。

b. 体外用药实验 取大鼠，以戊巴比妥钠40mg/kg腹腔注射麻醉，腹主动脉取血后，立即分置于各试管中，每试管用血2mL，EDTA抗凝处理后，取供试样品0.5mL轻轻混匀，置37℃水浴中孵育1h，取出，测定全血黏度和血浆黏度。

③ 观察指标及方法

a. 全血黏度（η_b） 用低剪切流变仪（Low shear-30）检测。选取的剪切率变化范围是0.0219～118.2s^{-1}，在37℃温度条件下由高切到低切进行检测。

b. 血浆黏度（η_p） 将血样离心5min（3000r/min），分离血浆，尽量去除细胞成分，并避免溶血。取分离所得血浆，用Lowshear-30黏度仪完成检测。取剪切率为1.607s^{-1}处左右5个点的平均值为血浆黏度。

c. 降黏活性指数的定义和计算 降黏活性指数=[（未用药黏度－用药后黏度）/未用药黏度]×100%，将实测到的全血表观黏度按此公式计算，指数大表示降黏活性高；反之降黏活性低。采用t检验法分析各组平均值间的差异，以$P<0.05$表示组间数据的差异有显著意义。

（4）结果

① 不同规格的当归、人参体内用药后对大鼠全血黏度的影响为血液非牛顿流体的特性。结果见表5-6。除归腿组外各组与对照组相比，全血黏度均有显著降低。

表 5-6　体内用药后不同规格的当归、人参对大鼠全血黏度的影响

组别	剂量/$g \cdot kg^{-1}$	n	全血表观黏度/mPa·s		
			$0.0219s^{-1}$	$1.607s^{-1}$	$118.2s^{-1}$
对照组	0	6	181.84±58.10	26.62±10.59	1.81±0.46
全归组	10	6	65.85±20.99①	8.17±0.33①	1.27±0.03②
归头组	10	6	75.48±16.39①	11.30±1.27①	1.3±0.003②
归腿组	10	6	153.72±18.56	23.44±6.86	1.65±0.02
移山参组	10	6	69.99±9.37①	10.06±1.41①	1.24±0.04②
生晒参组	10	6	115.29±15.52②	15.78±3.81②	1.25±0.02②

① 与对照组比较，$P<0.01$。

② 与对照组比较，$P<0.05$。

② 不同规格的当归、人参体外用药后大鼠全血黏度的变化与体内用药实验的变化趋势一致。

③ 不同商品规格的当归、人参均表现出了降低血浆黏度的作用，体内实验和体外实验均表现出了相似的结果。

④ 不同商品规格的当归、人参体外用药后的降黏活性指数与体内实验结果进行比较，发现其活性强度变化与体内实验结果基本相似，仅有当归组在 $1.607s^{-1}$ 处与体内用药实验结果顺序稍有不同（见表 5-7、表 5-8、表 5-9、表5-10）。

表 5-7　体外用药后不同规格的当归、人参对大鼠全血黏度的影响

组别	剂量/$mg \cdot mL^{-1}$	n	全血表观黏度/mPa·s		
			$0.0219s^{-1}$	$1.607s^{-1}$	$118.2s^{-1}$
对照组	0	4	195.07±24.22	35.22±4.85	1.64±0.13
全归组	500	4	89.96±13.66①	28.75±1.98②	1.26±0.04②
归头组	500	4	129.02±18.17①	19.18±1.28①	1.27±0.05①
归腿组	500	4	163.52±20.21	30.65±6.12	1.57±0.05
移山参组	500	4	35.68±3.88①	6.94±0.52①	1.28±0.03②
生晒参组	500	4	52.15±11.64①	9.52±1.00①	1.31±0.01①

① 与对照组相比，$P<0.01$。

② 与对照组相比，$P<0.05$。

表 5-8　不同商品规格的当归、人参对大鼠血浆黏度的影响

组别	血浆黏度		组别	血浆黏度	
	体内实验(n)	体外实验(n)		体内实验(n)	体外实验(n)
对照组	6.21±1.15(6)	11.55±3.37(4)	归腿组	2.01±0.11①(6)	5.75±0.31②(4)
全归组	1.75±0.03①(6)	4.34±0.69①(4)	移山参组	1.81±0.02①(6)	2.53±0.12①(4)
归头组	3.00±0.81①(6)	4.88±0.35①(4)	生晒参组	1.87±0.04①(6)	5.70±0.27②(4)

① 与对照组相比，$P<0.01$。

② 与对照组相比，$P<0.05$。

表 5-9　体内用药实验不同商品规格的当归人参降黏活性指数的比较

组别	降黏活性指数/%		
	$0.0219s^{-1}$	$1.607s^{-1}$	$118.2s^{-1}$
全归组	60.54±10.89	64.13±10.11	29.06±2.33
归头组	49.37±12.17	50.18±3.53	27.83±0.94
归腿组	17.86±4.53①	13.39±4.06①	9.52±1.03①
移山参组	65.02±10.31	59.16±4.46	32.78±1.08
生晒参组	39.19±5.07②	36.23±3.23②	30.27±1.57②

① 与全归组、归头组比较，$P<0.01$。

② 与移山参组比较，$P<0.01$。

表 5-10　体外用药实验不同商品规格的当归人参降黏活性指数的影响

组别	降黏活性指数/%		
	$0.0219s^{-1}$	$1.607s^{-1}$	$118.2s^{-1}$
全归组	54.69±5.63	19.73±3.67	23.14±0.48
归头组	31.17±4.52①	46.45±6.96①	21.83±0.51①
归腿组	15.91±1.22①	14.97±2.29	5.17±0.15①
移山参组	81.17±4.12	80.17±1.02	21.05±0.06
生晒参组	71.61±10.73	72.04±2.05②	20.28±0.11②

① 与全归组、归头组比较，$P<0.01$。

② 与移山参组比较，$P<0.01$。

〖附〗 当归和人参均具有明显降低全血黏度和血浆黏度的作用。实验各组的作用强度有明显的差异。当归各组中作用强度的顺序是：全归＞归头＞归腿；人参各组的作用强度顺序是：移山参＞生晒参。此结果不仅可以作为临床用药选择的参考依据，而且还为不同商品规格当归、人参的品质评价提供了药理学方面的实验依据。

降黏活性指标的提出旨在对不同药材规格的降黏作用进行量化表达，也使不同实验条件下的结果具有可比性。

4. 泽兰

〖来源〗 本品为唇形科植物毛叶地瓜儿苗（*Lycopus lucidus* Turc2. *var. hirtus* Regel）的全草。

〖降低血液黏度测定〗

（1）材料　泽兰、牛膝、郁金、没药、五灵脂五味中药。

每个样品按常量 15g 计，分别编号，然后用浸渍法，用常水 400mL 浸泡 5 天，将浸出液浓缩至 300mL，滤过，测各滤液的 pH 值，作为实验用药液备用。

（2）仪器与试剂　毛管式血液黏度计。

（3）试剂　取正常人全血 24mL，按要求加入适量抗凝剂，备用。

（4）方法

① 实验用药物含量计算方法　临床单味中药常用量一般为15g，一日两次，早晚分服，如按一般人服用的药液90%被吸收计算，每次纯入体中药为6.75g吸收入血，那么在每4mL血液中存在单味中药为（6.75g÷4000mL）×4mL＝6.75mg（设正常人全身血量为4000mL）。而实验用药液300mL中含中药15g，每毫升中含中药量为：15g÷300mL＝50mg/mL，则约0.135mL药液中含中药6.75mg。

② 实验步骤　将正常人血液24mL分装在6个试管中，每个试管4mL。

分取上述药液0.135mL（即相当于6.75mg中药），分别加入到上述试管中，剩余一支试管作为正常血液黏度的试管。将上述混合液微微转动，使其混匀。

用毛管黏度计分别测试，先测正常血液黏度管，以后按编号顺序分别测试。

（5）结果　见表5-11。

表5-11　泽兰等中药对血液黏度的影响

序号	样品	pH	血浆比黏度	低切比黏度	高切比黏度
0	正常血液	7.44	1.75	7.8	6.45
1	牛膝	4.30	1.73	6.9	2.65
2	泽兰	4.86	1.66	7.71	3.38
3	郁金	5.06	1.66	5.38	4.35
4	没药	6.56	1.71	5.16	4.30
5	五灵脂	6.70	1.74	3.68	2.46

【附】　泽兰、牛膝、郁金、没药、五灵脂为活血化瘀中药，对血浆比黏度、全血低切比黏度和全血高切比黏度有一定的降低作用。

二、溶血指数的测定

柴胡

【来源】　本品为伞形科植物柴胡（*Bupleurum chinense* DC.）或狭叶柴胡（*Bupleurum scorzonerifolium* Willd.）的干燥根。前者习称"北柴胡"，后者习称"南柴胡"。

【溶血值测定】

（1）材料　Ⅰ南柴胡，Ⅱ南柴胡，Ⅲ北柴胡，Ⅳ大叶柴胡，Ⅴ大叶柴胡。

（2）仪器　显微镜，血球计数板等。

（3）试剂　2%兔红细胞混悬液：取新鲜兔血，除去纤维蛋白，用0.9% NaCl溶液洗涤、离心，取红细胞2mL，用0.9%NaCl溶液稀释至100mL即得。

（4）方法

① 样品溶液的制备　分别取样品各1.0g，加乙醇10mL，加热回流60min，滤过。分别取滤液各1mL，加乙醇至10mL定容。

② 红细胞计数　按表 5-12 所列各样品液与试液的量取样混匀，置 37℃恒温水浴中 60min，取出，轻轻摇匀后分别吸取 0.1mL，加 0.9%NaCl 溶液 0.9mL，混匀后，滴入血球计数板的计数室中进行红细胞计数，并反复取样计数 4 次，求平均值。

表 5-12　样品液与试液

试　验	样品量/mL	0.9%NaCl 溶液量/mL	2%兔红细胞混悬液量/mL
对照管	—	2.5	2.5
样品管	0.1	2.4	2.5

红细胞计数参照临床血液检验方法，取四角方格和中央方格，共计 5 个中方格的红细胞数。由于空白及各样品是在同一条件下按同一方式取样计数，所以在进行数据处理时不必计算每立方毫米中的红细胞总数，而仅按实际 5 个中方格的红细胞数计数即可。

③ 溶血值的计算　根据空白对照管及各样品管的红细胞数，按下式计算溶血值。

$$溶血值=\frac{空白对照管的红细胞数-样品管的红细胞数}{空白对照管的红细胞数}\times100\%$$

（5）结果　见表 5-13。

表 5-13　柴胡等的溶血测定结果

样品	红细胞计数/个				$X\pm S$	溶血值/%	P 值	
							与对照管比	与大叶柴胡比
Ⅰ	28	28	32	29	29±1.9	84.14	<0.001	<0.001
Ⅱ	33	37	38	34	36±2.4	75.34	<0.001	<0.001
Ⅲ	37	38	35	40	38±2.2	73.97	<0.001	<0.001
Ⅳ	127	138	134	125	129±3.9	22.64	<0.001	
Ⅴ	128	132	136	123	127±3.8	23.01	<0.001	
空白对照管	148	143	141	151	146±4.6			

〖附〗　柴胡与大叶柴胡属于不同的品种，两者所含皂苷成分有差异，而致溶血作用的强弱不同，采用以红细胞计数法测定不同样品的溶血值，结果表明，正品柴胡的溶血值均在 70%以上，而大叶柴胡不到 15%。适合加工成饮片时鉴定真伪。

三、等电点的测定

1. 蛤蚧

〖来源〗　本品为壁虎科动物蛤蚧（*Gekko gecko* Linnaeus）的干燥体。

〖蛋白等电点测定〗

（1）材料　蛤蚧、壁虎（*G. chinensis* Gray）、多疣壁虎（*G. japonicus*

Cdumeril et Bibron)、无蹼壁虎（*G. swinhonis* Gunther）、红瘰疣螈（*Tylototriton verrucosus* Anderson）的全体。

（2）仪器　751型紫外分光光度计。

（3）方法

① 试剂配制　配制1.00mol/L、0.10mol/L和0.01mol/L的醋酸溶液。

② 样品液制备　取样品各5g，加入10倍生理盐水，加少许石英砂研磨成匀浆状，超声波提取后，离心20～25min（3500r/min），取上清液备用。

③ 等电点测定　取10支干燥刻度试管，编号后按表5-14的顺序准确地加入各种试剂，最后各加1.00mL样品液，混合均匀。测pH，在330nm处测吸收度。以吸收度为纵坐标，pH值为横坐标，绘制等电点曲线，最大吸收度所对应的pH值即为等电点。

（4）结果　见表5-15、表5-16。

表5-14　等电点测定试剂

试管编号 / 加入试剂/mL	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
蒸馏水	2.4	3.2	0	2.0	2.5	3.0	3.5	1.5	2.75	3.38
1.00mol/L醋酸	1.6	0.8	—	—	—	—	—	—	—	—
0.10mol/L醋酸	—	—	4.0	2.0	1.5	1.0	0.5	—	—	—
0.01mol/L醋酸	—	—	—	—	—	—	—	2.5	1.25	0.62

表5-15　蛤蚧等等电点测定结果

样　品	$\overline{X}$(pH)	*RSD*/%	可信限
蛤蚧	4.492	0.19	4.492±0.010
壁虎	3.508	0.24	3.508±0.010
多疣壁虎	3.968	0.21	3.968±0.010
无蹼壁虎	3.920	0.26	3.920±0.012
红瘰疣螈	3.592	0.23	3.590±0.010

表5-16　蛤蚧等等电点均值的显著性测验

样品	*n*	$\overline{X}$	$\lvert\overline{X}_1-\overline{X}_2\rvert$	$S_{\overline{x}_1-\overline{x}_1}$	*t*样	*t*检表	显著性测验结论
蛤蚧		4.492					
壁虎		3.508	0.984	5.292×10^{-3}	662.95	3.36	$P<0.01$
多疣壁虎	5	3.968	0.524	5.792×10^{-3}	749.88	3.36	$P<0.01$
无蹼壁虎		3.920	0.572	5.831×10^{-3}	672.27	3.32	$P<0.01$
红瘰疣螈		3.592	0.900	5.792×10^{-3}	678.82	3.36	$P<0.01$

〖附〗　蛤蚧与其类似品的等电点区别明显（$P<0.01$），经5次测定，变异系数均小于0.5%。

2. 鹿角胶

【来源】 本品为鹿科动物梅花鹿（*Cervus nippon* Temminck）和马鹿（*Cervus elaphus* L.）的角经水煎熬浓缩制成的固体胶。

【蛋白等电点测定】

（1）材料　鹿角胶（编号为1、2、3），伪品鹿角胶（编号为A、B、C、D_1、D_2、E）。

（2）仪器　PHS-25型酸度计，WFZ800D_2型紫外-可见分光光度计。

（3）方法

① 精确配制0.1mol/L和0.01mol/L的醋酸溶液。

② 称取胶粒10g于烧杯中，加水使成8%。称定重量，于水浴上加热使熔化。取下，放冷，补充损失的水分，经G_3耐酸垂熔漏斗滤过，滤液备用。

③ 取10支10mL量瓶，按顺序编号1～10，在其中1～5号分别精密加入0.1mol/L的醋酸8mL、4mL、2mL、1.5mL、1mL；在6～10号瓶中分别加入0.01mol/L的醋酸8mL、4mL、2mL、1mL、0.5mL。然后依次加入已滤过的8%胶液1.00mL，最后加水至刻度，摇匀。静置0.5h后，测其pH值，并在600nm波长处测其吸光度。以吸光度为纵坐标，pH值为横坐标，绘出各样品的等电点曲线，其最高值即为样品的等电点。

（4）结果　见表5-17。

表5-17　鹿角胶的等电点测定结果（$n=4$）

样品	测得值				$\overline{X}\pm S$	$RSD/\%$	t①检验
	1	2	3	4			
1	4.33	4.38	4.35	4.38	4.36±0.03	0.57	
2	4.35	4.34	4.31	4.36	4.34±0.03	0.51	$P>0.05$
3	4.35	4.40	4.40	4.37	4.38±0.03	0.57	$P>0.05$
A	4.73	4.75	4.74	4.73	4.74±0.01	0.21	$P<0.01$
B	4.92	4.95	4.91	4.94	4.93±0.03	0.51	$P<0.01$
C	4.93	4.91	4.90	4.94	4.92±0.02	0.37	$P<0.01$
D_1	4.45	4.48	4.46	4.48	4.47±0.02	0.34	$P<0.01$
	4.71	4.71	4.70	4.73	4.71±0.02	0.28	$P<0.01$
	5.06	5.04	5.00	5.04	5.03±0.03	0.52	$P<0.01$
D_2	4.84	4.88	4.91	4.87	4.88±0.04	0.61	$P<0.01$
E	4.75	4.73	4.77	4.76	4.75±0.02	0.36	$P<0.01$

① t检验均与1号样品比较。

【附】 鹿角胶虽产地不同，但其等电点值非常接近，统计学上无显著性差异（$P>0.05$）；与伪品比较有显著差异（$P<0.01$）。

四、氨基酸的测定

1. 薄荷

【来源】 本品为唇形科植物薄荷（*Mentha haplocalyx* Briq.）的干燥地上部分。

【游离氨基酸测定】

（1）材料 将薄荷用水冲洗去除泥沙后，用去离子水反复清洗，将部分薄荷的叶和茎分开，将材料分成叶、茎及整株3部分，晾干后放入烘箱中80℃烘干（约5h），粉碎过80目筛，分别装入广口瓶中备用。

（2）仪器 日立835-50型高速氨基酸自动分析仪。

（3）方法

① 样品液的制备 准确称取恒重的薄荷样品0.18g（误差至0.0018），放入10mL安瓿瓶中，加6mol/L盐酸溶液6mL，用酒精喷灯封口，在烘箱中110℃水解24h，取出冷却后，开瓶口将水解液转移至洁净烧杯中，放置在电炉上小火加热除尽盐酸，室温冷却后用pH2.0的盐酸溶液稀释，滤过，定容至50mL。

② 含量测定 用柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液洗脱，邻苯二甲醛-巯基乙醇法（O-PA-MCE法）后衍生荧光检测，激发波长360nm，发射波长450nm。

（4）结果 见表5-18。

表5-18 薄荷中游离氨基酸的含量 单位：mg/g

氨基酸种类	氨基酸相对分子质量	总氨基酸含量		
		叶	茎	整株
天冬氨酸(Asp)	133.1	12.65	5.40	8.90
苏氨酸(Thr)①	119.1	5.5	2.50	4.00
丝氨酸(Ser)	105.1	6.05	3.20	4.40
谷氨酸(Glu)	147.1	12.65	5.70	9.15
脯氨酸(Pro)	115.2	4.30	—	—
甘氨酸(Gly)	75.1	6.80	2.45	4.55
丙氨酸(Ala)	89.1	6.70	2.80	4.75
胱氨酸(Cys)	240.3	2.45	2.50	2.35
缬氨酸(Val)①	117.2	6.00	3.80	5.05
异亮氨酸(Ile)①	131.2	4.40	2.80	3.55
亮氨酸(Leu)①	131.2	9.45	4.80	7.45
酪氨酸(Tyr)	181.2	5.45	—	4.45
苯丙氨酸(Phe)①	165.2	5.65	—	4.60
赖氨酸(Lys)①	146.2	4.25	2.20	3.20
组氨酸(His)②	155.2	1.30	0.40	0.80
精氨酸(Arg)②	174.2	4.40	1.45	2.90
氨基酸总量		98.05	39.95	70.05
人体必需氨基酸		35.25	16.10	27.85
儿童必需氨基酸		5.70	1.85	3.70

① 为人体必需氨基酸。

② 为儿童必需氨基酸。

【附】 薄荷中含有大量的氨基酸，在实验条件下检测出16种氨基酸，总游离氨基酸含量叶、茎、整株中分别为9.805%、3.995%、7.005%（人体必需氨基酸分别占游离氨基酸总量的35.9%、40.30%、39.76%）。薄荷叶中的氨基酸含量最高。

2. 狗脊

【来源】 本品为蚌壳蕨科植物金毛狗脊（Cibotium barometz（L.） J. Sm.）的干燥根茎。

【氨基酸及总糖测定】

（1）材料 蚌壳蕨科植物金毛狗脊的干燥根茎（购于沈阳）。

（2）仪器 日立835-50型高速氨基酸自动分析仪等。

（3）方法

① 样品制备 取净狗脊饮片按药典法分别制备出砂烫狗脊、蒸狗脊、酒蒸狗脊和盐制狗脊，粉碎（20目筛）。

② 标准曲线的制备 取葡萄糖标准品100mg，精密称定，加水至100mL，并稀释成10μg/mL、20μg/mL、30μg/mL、40μg/mL、50μg/mL的标准溶液。再分别取各浓度标准溶液2mL，加入0.02mL苯酚、5mL浓硫酸，放置15min。以蒸馏水加显色剂为空白，于488nm波长处测定吸光度。以浓度为横坐标，以吸光度为纵坐标绘制标准曲线，并计算回归方程为：$A=0.00939C+0.04385$，$r=0.9956$。

③ 总糖的含量测定 取样品100mg，精密称定，于耐酸、耐压试管内，加入1mol/L H_2SO_4 45mL封闭后，于沸水浴水解7h。放冷，滤过，用饱和 $Ca(OH)_2$ 调pH=4～5，放置过夜，滤入500mL量瓶中，并稀释至刻度。分别取2mL加显色剂，用标准曲线法测定，由回归方程计算样品中含总糖的量（以葡萄糖计）。

④ 游离氨基酸的测定 取样品粉末1g，分别以30%乙醇渗漉至茚三酮反应阴性为止，取渗漉液于水浴上挥去乙醇，水层以10mL乙醚萃取脱脂。弃去乙醚层，水层在水浴上蒸干。然后以0.02mol/L盐酸溶解，定量转移至10mL量瓶中，并稀释至刻度，作为供试品溶液。

⑤ 水解氨基酸的测定 取样品粉末100mg加6mol/L盐酸置15mL安瓿瓶中。抽真空后，再充入纯氮，封管，置105℃连续水解24h。冷却后移入25mL量瓶中，并用6mol/L盐酸稀释至刻度。然后蒸去盐酸，用0.02mol/L的盐酸溶解，测定。

（4）结果 见表5-19、表5-20、表5-21。

【附】 狗脊生品含糖和游离氨基酸的量均高于炮制品，而水解氨基酸的含量则是炮制品高于生品。

表 5-19　狗脊中总糖的含量（$n=4$）

样品	总糖含量(以质量计)/%	*RSD*/%	样品	总糖含量(以质量计)/%	*RSD*/%
生狗脊	57.9	4.82	酒蒸品	56.3	4.96
砂烫品	55.8	4.79	盐炙品	52.4	4.35
单蒸品	56.5	4.84			

表 5-20　狗脊中游离氨基酸的含量　　单位：mg/g

氨基酸	生品	砂烫	单蒸	酒蒸	盐炙
天冬氨酸	2.24	6.60	0.19	0.89	—
苏氨酸	—	0.19	0.28	—	0.44
丝氨酸	0.57	0.33	0.60	0.39	—
谷氨酸	0.34	0.68	0.99	0.19	0.99
甘氨酸	0.43	0.26	0.40	0.30	0.29
丙氨酸	0.44	0.27	0.45	0.29	0.40
胱氨酸	0.78	—	—	0.79	—
缬氨酸	0.70	0.49	0.99	0.60	0.79
蛋氨酸	0.38	0.18	0.60	0.51	—
异亮氨酸	0.55	0.38	0.61	0.52	0.38
亮氨酸	0.40	0.21	0.82	—	0.28
酪氨酸	0.36	0.53	—	1.09	—
苯丙氨酸	0.82	0.19	0.91	—	0.77
赖氨酸	0.86	0.70	1.15	0.60	—
氨	9.56	3.83	4.14	8.82	1.99
精氨酸	0.33	—	—	—	—

表 5-21　狗脊中水解氨基酸的含量　　单位：mg/100g

氨基酸	生品	砂烫	单蒸	酒蒸	盐炙
天冬氨酸	203	194	232	193	212
苏氨酸	94	107	132	110	123
丝氨酸	130	158	189	153	170
谷氨酸	295	272	330	295	311
甘氨酸	188	148	174	154	164
丙氨酸	170	166	199	169	183
胱氨酸	—	—	—	—	—
缬氨酸	178	199	225	210	228
蛋氨酸	—	—	26	—	—
异亮氨酸	92	118	128	106	121
亮氨酸	203	238	278	233	247
酪氨酸	—	43	45	46	40
苯丙氨酸	90	97	115	94	104
赖氨酸	72	50	46	38	43
氨	53	44	45	45	62
组氨酸	41	34	49	37	38
精氨酸	102	77	109	89	102
脯氨酸	116	101	127	56	115

3. 天冬

〖来源〗 本品为百合科植物天冬［*Asparagus cochinchinensis*（Lour.）Merr.］的干燥块根。

〖氨基酸测定〗

（1）材料 天冬生品及炮制品（取天冬根放入沸水中煮至外皮易剥落，趁热剥除外皮，微火烘干）。

（2）仪器 日立 835-50 型氨基酸自动分析仪。

（3）方法 样品粉末 1g，加水 40mL，浸泡过夜，浓缩，残渣加水 30mL，回流 1.5h，滤过，合并滤液，浓缩，残渣液对茚三酮试液呈负反应，用 40％磺基水杨酸沉淀蛋白质，定容 10mL，离心 30min，取上清液测定。上样体积 50μL。

（4）结果 见表 5-22。

表 5-22 天冬氨基酸含量 单位：％

氨基酸	炮制前天冬	炮制后天冬	氨基酸	炮制前天冬	炮制后天冬
天冬氨酸	0.585	1.917	亮氨酸	0.043	0.094
苏氨酸	0.285	0.427	酪氨酸	微量	0.040
丝氨酸	0.068	0.299	苯丙氨胺	0.110	0.206
谷氨酸	0.468	1.278	赖氨酸	0.053	0.104
甘氨酸	0.033	0.058	游离酸	0.123	0.418
丙氨酸	0.066	0.105	组氨酸	0.021	0.090
缬氨酸	0.095	0.161	精氨酸	0.098	0.270
蛋氨酸	0.035	0.035	脯氨酸	2.724	0.219
异亮氨酸	0.051	0.142	总含量	4.858	5.863

注：以质量计。

〖附〗 炮制后的天冬氨酸含量明显增加，其中天冬氨酸含量显著增高，但脯氨酸的含量则降低近 10 倍。这一结果可能与各种氨基酸在天冬块根各组织中的分布比例不同有关，脯氨酸可能主要分布于根被部分。

4. 牡蛎

〖来源〗 本品为牡蛎科动物长牡蛎（*Ostrea gigas* Thunberg）、大连湾牡蛎（*Ostrea talienwhanensis* Crosse）或近江牡蛎（*Ostrea rivularis* Gould）的贝壳。

〖氨基酸测定〗

（1）仪器 日立 835-50 型高速氨基酸自动分析仪。工作条件：分析柱 2.6mm×150mm 不锈钢柱，内装 B 立 2619# 树脂，柱温 53℃，反应温度 98℃，缓冲液流速 0.225mL/min，茚三酮溶液流速 0.3mL/min。

（2）样品的制备及测定 用盐酸按常规方法制备水解液。1、4、6、8、9 号样品的分析浓度依次为 1.730mg/50μL、1.887mg/50μL、0.3290mg/50μL、

0.8715mg/50μL、0.3296mg/50μL。进样测定。

（3）结果　见表 5-23。

表 5-23　牡蛎中氨基酸的含量　　单位：%

样品号	1	4	6	8	9
天冬氨酸(Asp)	0.1049	0.0736	0.0799	0.1101	0.0864
苏氨酸(Thr)	0.0041	0.0027	0.0061	0.0073	0.0077
丝氨酸(Ser)	0.0167	0.0072	0.0361	0.0469	0.0500
谷氨酸(Glu)	0.0202	0.0150	0.0162	0.0245	0.0216
甘氨酸(Gly)	0.0484	0.0294	0.0473	0.0567	0.0506
丙氨酸(Ala)	0.0065	0.0036	0.0084	0.0080	微量
胱氨酸(Gys)	0.0016	0.0012	0.0057	0.0024	0.0052
缬氨酸(Val)	0.0060	0.0037	0.0105	0.0080	0.0108
蛋氨酸(Met)	—	0.0005	—	0.0038	—
异亮氨酸(Ile)	0.0032	0.0021	0.0082	0.0062	0.0078
亮氨酸(Leu)	0.0039	0.0025	0.0076	0.0073	0.0080
酪氨酸(Tyr)	—	0.0018			
苯丙氨酸(Phe)	0.0024	0.0017	0.0075	0.0055	0.0059
赖氨酸(Lys)	0.0067	0.0047	0.0057	0.0076	0.0069
组氨酸(His)	0.0005	0.0005	微量	0.0012	微量
精氨酸(Arg)	0.0055	0.0034	0.0069	0.0081	0.0068
脯氨酸(Pro)	0.0051	0.0031		0.0069	
总含量	0.2357	0.1567	0.2461	0.3105	0.2676

注：以质量计。

【附】牡蛎中氨基酸含量高低的顺序为：Asp＞Gly＞Ser＞Glu＞Val*＞Arg、Leu*、Ile*、Thr*、Lys*、Ala＞Phe*＞Cys＞Pro、Met*、Tyr、His，其中带*号者均为人体必需氨基酸。氨基酸的总含量为 0.15%～0.31%。

5. 水蛭

【来源】本品为水蛭科动物蚂蟥（*Whitmania pigra* Whitman）、柳叶蚂蟥（*Whitmania acranulata* Whitman）或水蛭（*Hirudo nipponica* Whitman）的干燥全体。

【氨基酸测定】

（1）仪器　日立 835-50 型高速氨基酸自动分析仪。

（2）方法　精密称取 50mg 水蛭粉，加入 6mol/L HCl 10mL 于封管中，置恒温箱中，加热 110℃ 24h 酸化水解，将其转移至蒸发皿中，蒸发至干，加入适量缓冲溶液定量转移至 10mL 容量瓶中，备用。上机测定。

（3）结果　见表 5-24。

【附】氨基酸总含量约占水蛭的 49%以上，其中人体必需氨基酸约占氨基酸总量的 39%以上。

表 5-24　水蛭中水解氨基酸含量　　单位：mg/100mg

名　称	1	含量 2	平均值	名　称	1	含量 2	平均值
门冬氨酸(Asp)	5.7705	5.2931	5.5318②	异亮氨酸(Ile)①	1.9962	1.9269	1.9616
苏氨酸(Thr)①	2.2772	2.1028	2.1900	亮氨酸(Leu)①	4.9707	4.6507	4.8107②
丝氨酸(Ser)	2.5046	2.2878	2.3962	酪氨酸(Tyr)	1.6492	1.4707	1.5600
谷氨酸(Glu)	8.6583	8.0094	8.3339②	苯丙氨酸(Phe)①	2.4078	2.2763	2.3421
甘氨酸(Gly)	3.1447	2.7454	2.9451	赖氨酸(Lys)①	3.8057	3.6959	3.7508②
丙氨酸(Ala)	2.9243	2.6269	2.7756	组氨酸(His)	1.5176	1.3937	1.4557
胱氨酸(Cys)	0.6671	0.3742	0.5207	精氨酸(Arg)	3.3467	3.1265	3.2366
缬氨酸(Val)①	3.3430	3.1948	3.2689②	脯氨酸(Pro)	1.7409	1.3354	1.5382
蛋氨酸(Met)①	0.7972	0.6912	0.7442	总氨基酸含量	51.5219	47.2017	49.3618

① 人体必需氨基酸；

② 水蛭中含量较高的氨基酸。

6. 枸杞子

【来源】 本品为茄科植物宁夏枸杞（*Lycium barbarum* L.）的干燥成熟果实。

【氨基酸测定】

（1）材料　宁夏枸杞（宁夏银川品一、二、三、四等），枸杞（南京江浦），北方枸杞（*L. chinensis* Mill. var. *polarinii*（Pojark.）A. M. Lu，河北辛集），津枸杞。

（2）仪器　日立 835-50 型高速氨基酸自动分析仪。测试条件：分析柱，2.6mm×150mm；脱氨柱，4mm×50mm；树脂，日立 2619 型；流动相，IPH-1～4；缓冲液（pH3.2，pH3.3，pH4.3，pH4.9）；柱温，53℃；检测，茚三酮显色，双波长比色计（570nm、440nm）；分析周期，72min。

（3）方法

① 样品液制备　取样品置超声波清洗器中先后用自来水和重蒸馏水清洗，烘干，制成细粉，105℃烘干至恒重。

② 游离氨基酸测定　精密称取样品粉末一定量，用 0.02mol/L 盐酸浸泡 24h，离心。取上清液，稀释到一定浓度，上机分析。

③ 水解后总氨基酸测定　精密称取样品粉末一定量，置于玻璃安瓿中，准确加入 6mol/L 盐酸，抽真空后充入高纯氮气反复三次，于真空状态下封管，130℃水解 6h，60℃真空干燥，室温下敞口静置 4h，除去盐酸，加 0.02mol/L 盐酸定容。滤过，离心，取上清液，稀释成一定浓度，上机分析。

（4）结果　见表 5-25、图 5-3、图 5-4、表 5-26。

表 5-25　枸杞子中牛磺酸（Tau）和氨基丁酸 γ-GABA 的含量　单位：%

	宁夏枸杞				枸杞	北方枸杞	津枸杞
	一等	二等	三等	四等			
Tau	0.689	0.582	0.595	0.449	0.205	0.613	0.327
γ-GABA	0.007	0.017	0.018	0.015	0.095	0.009	0.003

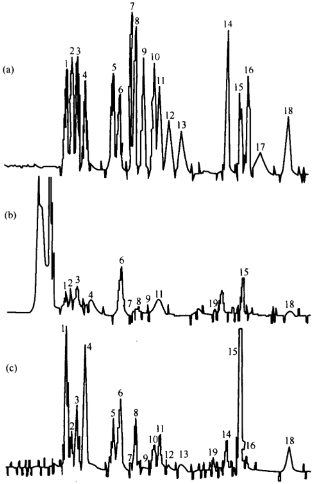
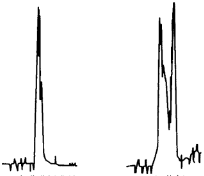


图 5-3　枸杞子氨基酸的分析图谱

1—Asp；2—Thr；3—Ser；4—Glu；5—Pro；6—Gly；7—Ala；8—Cys；9—Val；10—Met；11—Ile；12—Leu；13—Tyr；14—The；15—Lys；16—His；17—Trd；18—Arg；19—γ-ABA

(a) 氨基酸标准品；(b) 枸杞子中的游离氨基酸；(c) 枸杞子中的水解氨基酸



(a) 牛磺酸标准品　　(b) 枸杞子

图 5-4　枸杞子牛磺酸的分析图谱

表 5-26　枸杞子中氨基酸的含量　　　　单位：%

氨基酸	宁夏枸杞								枸杞		北方枸杞		津枸杞	
	一等		二等		三等		四等							
.	H	F	H	F	H	F	H	F	H	F	H	F	H	F
Asp	2.023	0.029	1.913	0.041	2.304	0.047	2.358	0.063	3.513	0.219	3.579	0.087	2.093	0.014
Thr	0.320	0.037	0.321	0.100	0.441	0.110	0.475	0.071	0.629	0.132	0.377	0.006	0.414	0.011
Ser	0.497	0.050	0.476	0.083	0.609	0.073	0.661	0.077	0.823	0.135	0.520	0.032	0.545	0.021
Glu	2.162	0.018	2.031	0.025	2.450	0.026	2.384	0.035	3.535	0.200	1.173	0.010	2.401	0.020
Pro	0.775	0.649	0.983	0.823	0.988	0.592	0.778	0.441	0.936	0.425	0.582	0.255	0.909	0.390
Gly	0.331		0.313		0.429		0.496		0.787		0.342		0.515	
Ala	0.796	0.142	0.773	0.256	0.904	0.251	0.931	0.222	0.152	0.354	0.492	0.057	0.745	0.072
Cys	0.115	0.016	0.125	0.016	0.115	0.017	0.152	0.020	0.242	0.032	0.151	0.018	0.147	0.008
Val	0.400	0.013	0.402	0.016	0.474	0.017	0.560	0.021	0.821	0.062	0.409	0.018	0.574	0.013
Met	0.032	0.015	0.036	0.012	0.022	0.009	0.073	0.014	0.132	0.027	0.047	0.031	0.061	0.003
Ile	0.250	0.130	0.261	0.120	0.380	0.087	0.393	0.058	0.623	0.054	0.264	0.104	0.410	
Leu	0.499		0.545		0.673		0.745		1.151	0.090	0.474		0.761	0.093
Tyr	0.163		0.158		0.218		0.257		0.430	0.068	0.238		0.255	
The	0.329		0.319		0.398		0.471		0.816	0.066	0.351		0.502	
Lys	0.267		0.290		0.383		0.440		0.723	0.033	0.317		0.404	0.004
His	0.138		0.155		0.149		0.228	0.011	0.549	0.127	0.157	0.011	0.196	0.005
Trd										0.046				
Arg	0.717	0.026	0.773	0.053	0.986	0.068	1.115	0.107	1.823	0.303	0.530	0.046	0.999	0.055
Total	9.896	1.810	9.945	2.060	11.999	1.910	12.580	1.600	18.780	2.670	10.070	1.290	11.990	1.040

注：H 为水解后总氨基酸；F 为游离氨基酸。

〖附〗 宁夏枸杞子几个等级的含量为 9.896%～12.580%；北方枸杞子为 10.070%；津枸杞子为 11.990%；南京江浦野生的枸杞含量最高，达 18.780%。

枸杞子游离氨基酸的百分含量均在 1%以上。南京江浦野生的枸杞子游离和水解后氨基酸的含量均高于其他样品。

7. 红曲

〖来源〗 本品为曲霉科真菌紫红曲霉（*Monacus purpureus* Went）寄生在粳米上发酵而成。

〖氨基酸测定〗

（1）材料　见表 5-27。

表 5-27　红曲样品来源

编号	来　源	产地	编号	来　源	产地
H01	山东省淄博市药材公司	山东周村	H06	福建省福州市药材公司	福建古田
H02	湖北省武汉市药材公司	不详	H07	广东省广州市药材公司	广东蕉岭
H03	湖南省长沙市药材公司	不详	H08	上海市药材公司	广东五华
H04	江苏省江阴市药材公司	江苏江阴	H18	实验室诱变育种所得菌株在粳米上发酵而成	实验室
H05	浙江省永康市药材公司	浙江永康			

（2）仪器与试剂　Beckman 119CL 型氨基酸自动分析仪；日本岛津 GC-7A 型气相色谱仪。

（3）试剂　氨基酸标准混合对照品（Beckman 公司）；脂肪酸甲酯气相色谱标准品（Sigama 公司）等。

（4）方法

① 测试条件　分析柱，22cm×0.75cm；树脂为 W-3H 型 Spherical 树脂；流动相，柠檬酸钠缓冲液 A（pH3.25）、柠檬酸钠缓冲液 B（pH4.12）、柠檬酸钠缓冲液 C（pH6.40）；流速，44mL/h；显色，茚三酮，流速 22mL/h；柱温 50℃～65℃；水浴温度 100℃；缓冲泵压力 600psi～650psi（1psi＝6894.76）；氮气压 10psi。样品液进样量 50μL。

② 供试品溶液的制备　取红曲样品适量，用蒸馏水冲洗干净，烘干，粉碎（60 目），60℃烘干 24h，备用。

③ 游离氨基酸测定　精密称取样品粉末各 1g，分别加 0.02mol/L 盐酸 50mL，振摇冷浸 24h，滤过。残渣再浸 1 次，滤过，合并 2 次滤液，调 pH 值为 2.0，通过聚苯乙烯二乙烯苯磺酸型阳离子树脂柱，用蒸馏水冲洗至近中性，以 1mol/L 氨水洗脱，收集洗脱液，用茚三酮检查至无氨基酸反应为止。洗脱液水浴蒸干，用 0.03mol/L 盐酸将残渣完全溶解定容至 50mL，上机测试。

④ 水解氨基酸测定　精密称取样品粉末 0.1g，加 6mol/L 盐酸 5mL 于安瓿中，抽气密封，110℃水解 20h，滤过，照游离氨基酸分析的处理方法，净化后，定容至 50mL，上机测试。

（5）结果　见表 5-28、表 5-29。

表 5-28　红曲及粳米中游离氨基酸的含量　　单位：mg/g

氨基酸	H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H18	GM
牛磺酸(TAU)②	0.019	0.059	0.125	0.165	0.025	0.068	0.135	0.015	0.014	0.034
天冬氨酸(Asp)②	0.818	0.622	0.305	0.431	0.565	0.563	1.193	0.678	0.642	0.033
苏氨酸(Thr)①	0.243	0.162	0.068	0.118	0.138	0.140	0.189	0.198	0.292	0.025
丝氨酸(Ser)	0.497	0.416	0.496	0.498	0.447	0.375	0.562	0.473	0.445	0.044
谷氨酸(Glu)②	1.290	0.366	0.083	0.211	1.018	0.664	0.889	0.438	0.953	0.021
脯氨酸(Pro)	0.207	0.266	0.189	0.087	0.136	0.259	0.372	0.576	0.376	-
甘氨酸(Gly)②	0.405	0.941	1.415	1.746	0.491	0.551	0.723	0.879	0.368	0.025
丙氨酸(Ala)	0.959	0.721	1.108	0.825	0.657	0.806	0.645	1.132	1.412	0.016
胱氨酸(Cys)	0.017	0.043	0.083	0.126	0.072	0.054	0.095	0.107	0.223	0.037
缬氨酸(Val)①③	0.741	0.993	1.195	1.459	0.872	0.713	1.278	1.226	0.778	0.050
甲硫氨酸(Met)①	0.225	0.263	0.416	0.681	0.341	0.263	0.388	0.312	0.132	0.041
异亮氨酸(Ile)①	0.251	0.321	0.549	0.428	0.198	0.198	0.308	0.651	0.365	0.032
亮氨酸(Leu)①②③	0.725	0.507	0.611	0.448	0.698	0.477	0.662	0.601	1.024	0.021
酪氨酸(Tyr)②③	0.345	0.451	0.475	0.437	0.370	0.281	0.659	0.450	0.703	0.025
苯丙氨酸(Phe)①②③	0.412	0.859	0.511	0.625	1.357	0.993	0.663	0.909	0.150	0.098

续表

氨基酸	H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H18	GM
鸟氨酸(Orn)	1.813	0.332	0.256	1.714	0.952	1.691	1.267	0.059	0.418	0.023
赖氨酸(Lys)①②③	0.385	0.227	0.222	0.169	0.308	0.215	0.356	0.104	0.011	—
精氨酸(Arg)②③	0.865	0.653	0.434	0.279	0.675	0.614	1.092	0.351	1.152	0.036
总氨基酸含量	10.217	8.202	8.541	10.448	9.320	8.925	11.476	9.159	10.455	0.538
(必需/总量)/%	29.18	40.62	41.82	37.61	41.94	34.27	33.50	44.20	38.42	49.63
(药用/总量)/%	53.63	60.33	53.82	49.69	62.43	52.54	58.25	52.17	61.22	55.76
(增香/总量)/%	34.05	44.99	40.37	32.70	45.89	37.57	41.42	40.22	48.62	42.75

① 人体必需氨基酸 (essential AA);

② 药用氨基酸 (pharmacodynamic AA);

③ 增香剂氨基酸 (perfume adding AA)。

表 5-29 红曲及粳米中水解氨基酸的含量 单位：mg/g

氨基酸	H01	H02	H03	H04	H05	H06	H07	H08	H18	GM
牛磺酸(TAU)②	0.442	0.403	1.814	0.949	0.468	0.513	0.639	0.445	0.207	0.398
天冬氨酸(Asp)②	9.417	17.476	7.493	9.841	11.071	8.560	11.909	10.387	9.033	7.721
苏氨酸(Thr)①	5.364	4.044	3.619	3.556	4.313	10.654	6.655	4.154	3.403	2.527
丝氨酸(Ser)	3.203	4.616	2.909	3.003	4.910	2.968	5.970	3.854	3.199	2.661
谷氨酸(Glu)②	19.350	19.680	15.535	19.941	22.501	16.542	23.881	19.959	18.019	16.061
脯氨酸(Pro)	10.707	3.762	2.201	2.701	4.305	3.059	4.412	4.258	4.115	2.660
甘氨酸(Gly)②	5.009	4.627	3.638	5.009	5.631	4.199	5.813	5.265	11.439	4.389
丙氨酸(Ala)	6.031	5.639	4.418	6.139	6.801	4.950	7.105	6.647	6.842	4.613
胱氨酸(Cys)	0.656	1.107	0.832	0.869	1.381	0.988	1.482	0.764	0.729	0.484
缬氨酸(Val)①③	7.296	6.510	18.187	7.608	7.706	6.457	8.115	8.345	6.641	5.533
甲硫氨酸(Met)①②	2.784	2.826	2.711	3.186	3.172	2.442	3.411	3.303	2.288	2.065
异亮氨酸(Ile)①	5.256	5.365	4.509	5.559	6.188	4.587	7.683	5.814	4.564	3.713
亮氨酸(Leu)①②③	9.137	9.169	7.639	9.663	10.584	8.184	12.009	10.192	8.576	7.282
酪氨酸(Tyr)①③	10.201	4.067	3.238	4.035	4.701	2.926	4.908	4.532	4.068	3.093
苯丙氨酸(Phe)①②③	10.717	5.845	5.258	6.278	6.701	5.236	7.392	6.558	5.329	4.679
鸟氨酸(Orn)	3.222	0.851	0.761	0.951	1.466	2.114	2.434	1.609	0.553	0.439
赖氨酸(Lys)①②③	3.214	1.951	1.611	1.588	3.097	1.014	2.671	1.966	2.412	2.459
组氨酸(His)	2.085	1.661	1.454	1.732	2.335	1.606	2.058	1.747	2.159	1.858
精氨酸(Arg)②③	5.418	5.388	3.984	4.181	7.212	5.192	6.561	4.641	6.954	6.674
总氨基酸含量	119.509	104.987	91.819	96.789	114.542	92.121	123.108	104.454	100.299	79.309
(必需/总量)/%	36.62	34.01	47.84	38.22	36.46	42.58	44.71	44.98	33.11	36.01
(药用/总量)/%	62.96	67.66	56.16	65.06	65.19	59.92	64.33	64.38	67.12	69.12
(增香/总量)/%	38.48	31.37	43.86	34.05	34.92	32.47	33.84	34.69	33.88	37.47

① 人体必需氨基酸 (essential AA);

② 药用氨基酸 (pharmacodynamic AA);

③ 增香剂氨基酸 (perfume adding AA)。

〖附〗 粳米中水解氨基酸含量为 7.93%，但游离氨基酸含量很低，仅 0.054%。红曲中水解氨基酸为 9.0%～12.5%，比粳米稍高，其游离氨基酸含量却高达 0.81%～1.14%，为粳米的 15 倍～20 倍；可见，红曲霉菌可生物合成蛋白质并由于其富含有蛋白酶，从而产生大量游离氨基酸。各地产红曲中水解氨

基酸及游离氨基酸含量有一定差异。

共检测出19种氨基酸，其中有7种人体必需氨基酸（29%～45%），10种药用氨基酸（48%～63%），6种增香剂氨基酸（33%～49%）。

8. 薤白

〖来源〗 本品为百合科植物小根蒜（*Allium macrostemon* Bge.）的干燥鳞茎。

〖氨基酸的测定〗

（1）仪器 日立835-50型氨基酸自动分析仪。测定条件：分析柱，2.6mm×150mm；离子交换树脂，日立-2619型；分析时间72min；缓冲液流速0.255mL/min；茚三酮流速0.30mL/min；缓冲液泵压80～120kgf/cm^2；茚三酮泵压15～35kgf/cm^2；缓冲液改变5次；柱温53℃；样品进样量50μL；氮压力0.28kgf/cm^2（1kgf/cm^2=98.0665kPa）。

（2）方法

① 样品的制备 取薤白鲜品、干品，分别用自来水、蒸馏水、去离子水洗净，置干燥通风处阴干，100℃下干燥，瓷乳体研磨（60目），再干燥至恒重，置干燥器中备用。

② 总氨基酸样品 精密称取一定量样品，放入水解管中，加入100～500倍盐酸，抽真空，封管。在100℃水解20～24h，取出后蒸干，稀释至适当浓度，上机测定。

③ 游离氨基酸样品 精密称取一定量样品，用0.2mol/L HCl 1mL溶解，加入8mL重蒸馏水使其充分溶解，加入1mL 40%磺基水杨酸沉淀蛋白质，放置0.5h，离心20min（1000r/min），取上清液过夜后上机测定。

（3）结果 见表5-30。

表5-30 薤白中氨基酸的含量 单位：mg/100g

氨基酸	1		2		氨基酸	1		2	
	游离氨基酸	总氨基酸	游离氨基酸	总氨基酸		游离氨基酸	总氨基酸	游离氨基酸	总氨基酸
Asp	11.95	607.07	8.89	199.85	Leu	10.68	431.78	5.03	120.02
Thr	12.89	283.75	17.12	77.60	Tyr	34.08	163.98	53.45	90.07
Ser	11.67	356.88	12.30	113.17	Phe	14.36	268.23	165.34	174.37
Glu	11.78	1378.87	51.45	1643.99	Lys	8.55	286.66	30.37	167.21
Gly	4.87	354.77	10.01	85.29	His	8.65	154.07	8.04	46.98
Ala	35.00	400.14	56.89	115.33	Arg	375.99	918.16	238.52	27.89
Cys	14.01	36.35	41.22	124.21	Pro	136.15	648.81	136.78	146.85
Val	15.79	384.92	16.38	102.33	人体必需氨基酸含量	143.98	2000.43	319.91	814.74
Met	35.76	61.20	23.79	101.79					
Ile	45.95	283.89	61.88	72.02	总含量	788.13	7019.53	937.46	3048.37

注：1为鲜品；2为干燥品。

〖附〗 炮制前后的薤白氨基酸的含量存在明显差异。每100g鲜品中总氨基酸和游离氨基酸的含量分别为7019.53mg和788.13mg；人体必需氨基酸含量分别占总氨基酸和游离氨基酸的28.50%和18.27%。100g干燥品中总氨基酸和游离氨基酸的合量分别为3408.37mg和937.469mg；人体必需氨基酸分别占总氨基酸和游离氨基酸的23.90%和34.12%。

9. 鳖甲

〖来源〗 本品为鳖科动物鳖 *Trionyx sinensis* Wiegmann 的背甲。

〖氨基酸测定〗

(1) 材料　鳖甲生品（去残肉），食用菌炮制品，传统炮制品。

(2) 仪器　氨基酸分析用日立835-50型氨基酸自动分析仪。测试条件：分析柱，$\phi_{内}$ 2.6mm×250mm；脱氨柱，$\phi_{内}$ 4mm×50mm；树脂，2619# （日立）；流动相，IPH1～4（pH3.3、pH3.3、pH4.3、pH4.9）；柱温55℃；流量和压力，缓冲液0.275mL/min（125kg/cm²）、茚三酮0.3mL/min（25kg/cm²）；茚三酮显色，双波长检测计（570nm、440nm）；分析周期72min。

(3) 方法

① 游离氨基酸的测定　称取样品粉末100g，依次置于500mL渗漉筒中，用30%乙醇渗漉，收集渗漉液至茚三酮反应阴性为止；用盐酸将渗漉液调至pH＝6～7，然后分别通过阳离子交换树脂柱，用蒸馏水洗至中性，再用5%的氨水洗脱，收集洗脱液至无茚三酮反应为止，减压蒸除氨，转入蒸发器中，在水浴上浓缩至一定体积，滤过，移入100mL容量瓶中，用蒸馏水稀释至刻度。取50μL，上机测定。

② 水解氨基酸的供试品制备　称取样品粉末56mg，置50mL玻璃安瓿瓶中，准确加入6mol/L HCl 20.00mL，抽真空封管，于110℃±1℃条件下水解24h，取出摇匀，放冷后开管，滤过，精密吸取滤液1.00mL，置约60℃以下减压挥干，加入0.8mL蒸馏水，再减压挥干，加入0.01mol/L NaOH 0.5mL，室温下敞口静置4h，移入5mL容量瓶中，加入0.02mol/L HCl至刻度。取50μL，上机测定。

(4) 结果 见表5-31、表5-32。

表5-31　鳖甲游离氨基酸的含量　　单位：%

测定值＼品名 氨基酸	鳖甲		
	传统炮制品	食用菌炮制品	生品
天冬氨酸(ASP)	12.75	8.99	132.90
苏氨酸[①](Thr)	5.44	4.20	62.64
丝氨酸(Ser)	10.50	7.31	111.99

续表

测定值 \ 品名 / 氨基酸	鳖甲		
	传统炮制品	食用菌炮制品	生品
谷氨酸(Glu)	23.49	16.54	262.09
甘氨酸(Gly)	50.93	37.22	260.43
丙氨酸(Ala)	21.94	16.28	238.07
胱氨酸(Cys)	2.78	2.87	4.01
缬氨酸①(Val)	6.94	5.98	57.61
蛋氨酸①(Met)	3.05	3.10	11.89
异亮氨酸①(Ile)	4.97	4.16	40.08
亮氨酸①(Leu)	7.41	6.12	72.17
酪氨酸(Tyr)		2.16	12.02
苯丙氨酸①(Phe)	5.20	4.93	56.23
赖氨酸①(Lys)	8.30	6.31	87.36
组氨酸(His)			19.24
精氨酸(Arg)	16.59	12.88	288.06
脯氨酸(Pro)	2.88	20.92	261.93
总氨基酸	183.20	159.97	1644.62

① 为人体必需氨基酸。

表 5-32 鳖甲水解氨基酸的含量 单位：%

测定值 \ 品名 / 氨基酸	鳖甲		
	传统炮制品	食用菌炮制品	生品
天冬氨酸(ASP)	1.34	1.29	1.71
苏氨酸①(Thr)	0.56	0.54	0.75
丝氨酸(Ser)	1.01	0.81	1.25
谷氨酸(Glu)	2.48	2.30	3.04
甘氨酸(Gly)	4.61	4.40	3.04
丙氨酸(Ala)	1.93	1.82	2.21
胱氨酸(Cys)	0.07	0.07	0.00
缬氨酸①(Val)	0.53	0.61	0.88
蛋氨酸①(Met)	0.17	0.07	0.28
亮氨酸①(Leu)	0.75	0.71	1.02
异亮氨酸①(Ile)	0.41	0.39	0.53
酪氨酸(Tyr)	0.28	0.26	0.38
苯丙氨酸①(Phe)	0.52	0.48	0.55
赖氨酸①(Lys)	0.72	0.68	0.98
组氨酸(His)	0.18	0.18	0.31
精氨酸(Arg)	1.71	0.99	2.02
脯氨酸(Pro)	2.59	2.50	2.97
总氨基酸	19.68	18.08	31.91

① 为人体必需氨基酸。

〖附〗 鳖甲生品中游离氨基酸的含量明显高于炮制品；水解后氨基酸的测定表明：生品中的含量也略高于传统炮制品，说明炮制过程中两种状态的氨基酸都有不同程度的损失，提示炮制方法有待改进，以便减少氨基酸的损失。

五、其他单纯指标的测定

1. 白芷

〖来源〗 本品为伞形科植物白芷［*Angelica dahurica*（Fisch. ex Hoffm.）Benth. et Hook. f.］或杭白芷［*A. dahurica*（Fisch. ex Hoffm.）Benth. et Hook. f. var. *formosana*（Boiss.）Shan et Yuan］的干燥根。

〖抗炎、镇痛作用测定〗

（1）材料 川白芷（四川遂宁），杭白芷（浙江余杭），禹白芷（河南禹县），滇白芷（*Heracleum scabridum*）（云南大理）。

（2）试剂 取样品饮片适量，煎煮30min，滤过，将滤液制成浓度为1g/mL的溶液，备用。

（3）方法

① 抗炎作用的检测 对二甲苯所致小鼠耳部炎症的影响：取体重20～24g小鼠，雌雄各半，随机分组。给小鼠灌胃药液，待4h后，以二甲苯0.05mL涂抹于小鼠左耳，右耳作对照，2h后，用直径7mm打孔器取下小鼠左右两耳中间同一部位，用电光天平快速称重。求出两耳重量差，同时用生理盐水和氢化可的松对照，并计算抑制率。结果见表5-33。

表5-33 白芷的抗炎作用（对二甲苯所致耳部炎症的影响）

药物	剂量	动物数	炎症肿胀度/mm	抑制率/%
生理盐水	4mL/kg	10	5.01±3.12	
氢化可的松	15mg/kg	12	2.85±2.20①	44.3
川白芷	4g/kg	10	2.78±2.67①	46.7
杭白芷	4g/kg	10	2.59±2.34①	48.1
禹白芷	4g/kg	10	3.14±2.72①	39.8
滇白芷	4g/kg	10	2.41±2.07①	52.5

① $P<0.01$。

② 镇痛作用的检测

a. 扭体法 取小白鼠，体重18～22g，先以药液灌胃给药，2h后，腹腔注射1%醋酸（0.1mL/kg），10min后观察小鼠扭体次数。同时，用生理盐水和氨基比林作对照。结果见表5-34。

b. 热板法 热板温度（55±0.5）℃，选小白鼠18～22g，痛阈在30min以内者。给药前测痛阈，以药液灌胃，给药后按规定时间测痛阈。结果见表5-35。

表 5-34　白芷对小鼠的镇痛作用（扭体法）

药物	剂量	动物数	扭体次数	抑制率/%	药物	剂量	动物数	扭体次数	抑制率/%
生理盐水	8g/kg	12	22.5±3.0		杭白芷	8g/kg	10	8.4±2.5①	60.31
氨基比林	8mg/kg	12	6.5±3.7①	71.36	禹白芷	8g/kg	12	7.2±2.0①	67.52
川白芷	8g/kg	12	6.9±1.9①	69.61	滇白芷	8g/kg	12	11.2±4.7①	50.66

① $P<0.001$。

表 5-35　白芷对小鼠的镇痛作用（热板法）

药物	给药前痛阈/min	给药后痛阈(min)/抑制率(%)			
		给药后 30min	给药后 60min	给药后 90min	给药后 120min
生理盐水	22.6	22.3/−10.2	23.1/−8.9	25.4/5.8	22.5/−14.6
氨基比林	23.7	41.6/5.19③	35.7/40.8③	34.2/28.1②	36.4/35.0②
川白芷	25.9	32.5/22.4①	38.6/45.4③	29.7/15.2	34.1/30.3②
杭白芷	20.8	25.7/4.6②	29.3/7.4②	32.5/10.4①	32.2/11.7①
禹白芷	22.4	23.9/2.7②	30.8/35.6③	31.3/37.5②	29.6/30.2②
滇白芷	23.3	25.1/12.0②	25.4/12.7②	34.0/45.9②	28.8/23.6①

① $P<0.05$；② $P<0.01$；③ $P<0.001$。

注：$n=10$，给药剂量 8g/kg。

③ 解热作用的检测　取大白兔 1.7～1.8kg，雌雄兼用。用 10%的蛋白胨背部皮下注射，先成高热动物模型，注射后 30min 测体温，以升高 0.8℃以上者为实验动物。然后，分别用药液灌胃给药。结果见图 5-5。

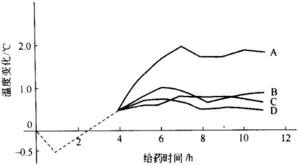


图 5-5　白芷的解热作用比较

A—生理盐水 1.5mL/kg；B—滇白芷 15g/kg；C—阿司匹林 0.1g/kg；

D—川白芷 15g/kg［虚线表示皮下注射蛋白胨（1.0g/kg）4h 内兔体温变化］

④ 急性毒性实验　取小白鼠 100 只，体重 18～22g，雌雄各半，随机分组。按寇氏法分别以药液灌胃给药。在 15～19h 出现死亡高峰。结果见表 5-36。

〖附〗 白芷有镇痛、抗炎、解热等作用。川白芷、杭白芷、禹白芷和滇白芷等不同商品规格在药理作用上无明显差异。从白芷的解热作用实验效果看，均与阳性药物阿司匹林接近，而川白芷解热效果还优于阿司匹林。

表 5-36　白芷的急性毒性实验

药物	$LD_{60}/g \cdot kg^{-1}$	SX_{60}	95%	药物	$LD_{60}/g \cdot kg^{-1}$	SX_{60}	95%
川白芷	42.58	0.031	48.83～37.72	禹白芷	45.29	0.026	50.93～40.28
杭白芷	41.97	0.033	47.06～36.70	滇白芷	46.74	0.024	52.17～41.88

2. 红花

【来源】 本品为菊科植物红花（*Carthamus tinctorius* L.）的干燥花。

【活血化瘀作用测定】

（1）材料　分别采自新疆吉木萨尔县、河南新乡县、四川简阳县、云南巍山县 4 个栽培居群盛花期的红花。

实验家兔 4 只，实验前饲养 1 个月，体重（2.5±0.3）kg。

（2）仪器与试剂　SPA 型血小板聚集仪，ADP，ST_4Bio 型半自动血液凝固测定仪（法国 Diagnostica Stago）。

（3）试剂　抗肝素钙凝血活酶，部分凝血活酶等。

（4）方法

① 血小板聚集抑制率的测定　将家兔在戊巴比妥钠麻醉（40mg/kg）情况下，由颈动脉放血，3.8%柠檬酸钠抗凝（9∶1），离心 8min（500r/min），吸取上层液，即为富血小板血浆（PRP）。将剩余的血浆离心 10min（3500r/min），即为贫血小板血浆（PPP），进行血小板计数[(3.3±0.2)×108 个/mL]。ADP 诱导血小板聚集，绘制血小板聚集曲线，计算最大聚集率。

在 PRP 中加入 10μL 0.20g/mL 的红花水提液，绘制加药后血小板聚集曲线，计算聚集率。根据加药前后的 PRP 聚集率，计算抑制率。

$$抑制率=\frac{ADP聚集率-加药后聚集率}{ADP聚集率}\times 100\%$$

② 测凝血酶原时间　取 0.5mL 经离心 10min（3000r/min）后的家兔血浆，加入等量的红花水提液（0.24g/mL），测凝血酶原时间。

③ 测部分凝血活酶时间　加入红花水提液（0.16g/mL），方法同上。

④ 统计学处理　实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，结果以方差分析法对不同居群间进行比较。

（5）结果

① 对血小板聚集的抑制作用　红花各居群对 ADP 诱导的血小板聚集均有明显的抑制作用。其中吉木萨尔居群（$P<0.01$）>简阳居群（$P<0.01$）>巍山居群和新乡居群（$P>0.05$）（表 5-37）。

② 对凝血酶原时间的延长作用　红花各居群对凝血酶原时间均有非常显著的延长作用（$P<0.001$）。其中巍山居群（$P<0.01$）>简阳居群（$P<0.01$）>新乡居群和吉木萨尔居（$P>0.05$）。

表 5-37　红花不同栽培句群的活血化瘀作用（$n=4$）

分　　组	血小板聚集的抑制率 t/%	凝血酶原时间 t/s	部分凝血活酶时间 t/s
吉木萨尔居群	67.5±2.5①	23.8±0.1②	84.4±6.4②
新乡居群	37.5±5.0	26.3±0.5②	87.3±3.3②
简阳居群	57.7±2.3①	43.0±1.9①②	99.5±6.3①②
巍山居群	42.5±4.7	>70.0①②	119.1±1.8①②
对照组		7.2±0.2	23.9± 0.2

① $P<0.01$ 组间差异；

② $P<0.05$ 与对照组差异。

③ 对部分凝血活酶时间的延长作用　红花各居群对部分凝血活酶时间均有非常显著的延长作用（$P<0.001$）。其中巍山居群>简阳居群>新乡居群和吉木萨尔居群（$P>0.05$）（表 5-37）。

3. 广藿香

〖来源〗 本品为唇形科植物广藿香［Pogostemon cablin（Blanco）Benth.］的干燥地上部分。

〖对胃肠活动和功能的影响作用测定〗

（1）材料　高要与吴川产藿香水提物、去油水提物和挥发油混悬液。

新西兰兔（体重 2.3kg±0.6kg），Wistar 大鼠（体重 200.0g±2.0g）和 NIH 小鼠（体重 20.0g±2.0g），由广东省医用实验动物场提供（合格证号 98A032），雌雄兼用。

（2）试剂　乙酰胆碱，氯化钡，甲基硫酸新斯的明，阿利新蓝（Facro 公司），淀粉酶测试盒，番泻叶（配制成 1∶1 水提液）。

（3）方法

① 对胃肠运动功能的影响

a. 对小鼠胃排空的影响　小鼠 120 只，实验前禁食 24h，实验分为两大组，即高要组与吴川组，每大组分为 4 组，分别灌胃高要与吴川产藿香水提物、去油水提物、挥发油混悬液和生理盐水，40min 后灌胃 0.1%甲基橙 0.2mL，20min 后处死，取胃剖开，用 10mL 蒸馏水冲洗，洗液用 $NaHCO_3$ 调 pH 值至 6～6.5，离心后取上清液测定 A_{420}，甲基橙残留率（%）$=A_{胃液}+A_{基数}\times100$，以甲基橙残留率的高低反映胃排空的快慢（表 5-38）。

b. 对离体肠平滑肌自发收缩活动的影响　取新西兰兔，常法制备离体空肠管标本，放入充有 O_2 的台氏液中保存备用。实验时取肠管 2cm，置 37℃麦氏浴槽中，不断通入 O_2，记录肠道平滑肌的自发收缩活动，待收缩曲线稳定后，分别加入高要与吴川产藿香水提物、去油水提物和挥发油混悬液 0.5mL，观察药物对肠道平滑肌自发收缩活动的影响（表 5-39）。

对乙酰胆碱及氯化钡引起离体兔肠平滑肌收缩的影响：离体肠管制备方法同

上，待收缩曲线稳定后，加入 0.1μmol/L 乙酰胆碱或 2.0mmol/L 氯化钡引起肠管痉挛性收缩，然后分别加入 0.5mL 上述药剂，观察药物对肠道平滑肌收缩活动的影响（表 5-39）。

表 5-38　高要与吴川产藿香提取物对小鼠胃排空的影响（$n=15$）

药　　物	甲基橙残留率/%	
	高要组	吴川组
生理盐水	58.32±7.20	52.73+6.18
水提物(生药 20g/kg)	69.73±5.89②	63.31±9.85①
去油水提物(生药 20g/kg)	72.89±7.31③	61.03±9.82①④
挥发油混悬液(200μL 挥发油/kg)	52.89±8.09	42.20±8.32①④

① 与生理盐水组比较，$P<0.05$。

② 与生理盐水组比较，$P<0.01$。

③ 与生理盐水组比较，$P<0.001$。

④ 与高要产藿香比较，$P<0.05$。

表 5-39　高要与吴川产藿香提取物对离体兔肠平滑肌自发收缩及乙酰胆碱和氯化钡引起离体兔肠平滑肌收缩的影响（$n=6$）

药　　物	自发收缩蠕动降低幅度/mm		乙酰胆碱收缩抑制率/%		氯化钡收缩抑制率/%	
	高要组	吴川组	高要组	吴川组	高要组	吴川组
水提物(生药 5.0g/L)	5.40±3.78	5.80±3.33	94.00±26.08	94.39±24.52	69.56±24.29	32.95±10.63①
去油水提物(生药 5.0g/L)	5.70±2.73	6.00±3.74	145.83±37.50	85.00±22.36①	98.70±28.07	38.39±12.11①
挥发油混悬液(50.0μL 挥发油/L)	7.00±2.92	6.80±3.90	301.00±88.20	259.71±26.89	138.67±23.64	73.81±21.87①

① 与高要产藿香比较，$P<0.01$。

c. 对正常小鼠肠推进运动的影响　小鼠 80 只，禁食 12h 后，实验分组及给药同上，20min 后灌胃墨水 0.5mL，再过 20min 后处死，测量幽门起墨汁最远运行端及幽门至回盲端的长度，两者之比为肠推进率（表 5-40）。

表 5-40　高要与吴川产藿香提取物对正常小鼠肠推进运动的影响（$n=10$）

药　　物	肠推进率/%	
	高要组	吴川组
生理盐水	72.44+12.92	72.51±14.12
水提物(生药 4.0g/kg)	54.44±8.79②	57.52±10.15①
去油水提物(生药 4.0g/kg)	58.60±13.20②	68.78±14.14
挥发油混悬液(4.0μL 挥发油/kg)	67.81±9.44	62.25±12.30①

① 与生理盐水比较，$P<0.05$。

② 与生理盐水比较，$P<0.01$。

② 对大鼠胃酸分泌及胃蛋白酶活性的影响　大鼠 80 只，实验前禁食 24h，实验分组同上，用戊巴比妥钠麻醉后，结扎幽门和贲门，分别注入两产地 3 种提取物和生理盐水，2h 后处死，收集胃液，离心后取上清 0.5mL，加入酚红指示剂 1 滴，用 0.2mol/L NaOH 标准溶液滴定。按改良 Anson 法测定胃蛋白酶活性（表 5-41）。

表 5-41　高要与吴川产藿香提取物对大鼠胃分泌功能的影响（$n=10$）

药　　物	胃液总酸度/mmol・L^{-1}		总酸排出量/μmol・h^{-1}		胃蛋白酶活力（酪氨酸）/μmol・mL^{-1}・min^{-1}）	
	高要组	吴川组	高要组	吴川组	高要组	吴川组
生理盐水	17.77±4.45	14.99±2.62	28.17±6.55	24.37±3.98	8.21±0.99	8.14±0.91
水提物（生药 2.0 g/kg）	33.26±4.36②	37.34±3.17②	50.14±9.01②	64.87±9.91④	19.79±2.21②	17.86±2.74②
去油水提物（生药 2.0g/kg）	49.73±7.26②	37.10±7.87④	79.37±14.03②	56.33±9.62④	19.26±2.15②	16.27±1.91④
挥发油混悬液（20.0μg 挥发油/kg）	13.13±5.10①	14.10±1.89	19.27±6.64②	17.75±4.06①	12.93±2.36②	14.92±1.75②

① 与生理盐水比较，$P<0.05$。
② 与生理盐水比较，$P<0.01$。
③ 与高要产藿香比较，$P<0.05$。
④ 与高要产藿香比较，$P<0.01$。

③ 对小鼠血清淀粉酶活力的影响　小鼠 120 只，实验分组和给药同上，连续给药 3d，末次给药后 1h 眼眶取血，分离血清，按淀粉酶测试盒说明书，采用碘比色法测定淀粉酶活力，以每 100mL 血清 15min 水解淀粉的酶量为 1 个活力单位表示酶活力（表 5-42）。

表 5-42　高要和吴川产藿香提取物对小鼠血清淀粉酶活力的影响（$n=15$）

药　　物	淀粉酶活力/U	
	高要组	吴川组
生理盐水	680.80±57.84	612.22±47.31
水提物（生药 2.0g/kg）	723.60±53.45①	693.62±44.89①
去油水提物（生药 2.0g/kg）	712.53±52.89①	677.33±34.59①
挥发油混悬液（20.0μL 挥发油/kg）	704.00±71.39①	660.62±36.14

① 与生理盐水组比较，$P<0.01$。

④ 对番泻叶引起小鼠腹泻的影响　小鼠 80 只，实验分组同上，禁食 12h 后均灌胃番泻叶水煎剂 0.4mL，1h 后分别灌胃两产地 3 种提取物和生理盐水，随后立即单只放入垫有 20cm 直径滤纸的铁笼内，每隔 1h 更换滤纸一次，以外形不正常的软便、黏液便为腹泻便，记录 6h 内腹泻次数。结果表明：高要产藿香水提物、去油水提物减少番泻叶引起的腹泻次数。

⑤ 对冰醋酸引起的小鼠扭体反应的影响　小鼠120只，实验分组及给药同上，30min后灌胃0.6%冰醋酸10mL，记录15min内扭体次数。结果表明：高要与吴川产藿香三种提取物均可抑制冰醋酸引起的内脏绞痛。

4. 红景天

【来源】 本品为景天科植物大花红景天［Rhodiola crenulata（Hook. f. et Thoms.）H. Ohba］的干燥根茎。

【抗老化作用测定】

（1）材料　红景天（3年生），红景天素，人参茎叶皂苷。

2BS细胞与大鼠的实验有效最佳剂量分别为4μg/mL，以大鼠体重计每天10mg/kg，肌注。

（2）方法

① 培养细胞与动物　2BS细胞株是由长春生物制品所提供第28代实验用细胞株经本室液氮冻存，复苏后第34代细胞。培养液Eagle MEM（日本产），临用前加15%小牛血清、适量谷氨酰胺和抗生素。取传至第36代2BS细胞，分为加药组（红景天、人参）与不加药的对照组。

动物为20月龄，健康Wistar雄性大白鼠30只，平均体重450g。随机分为3组，每组各10只，加药组除普通饲料外每天上午肌注给药（红景天、人参）。对照组为生理盐水。连续给药30天后，分别将3组动物切颈致死，取肝等器官备实验用。

② 实验方法与观察指标　2BS细胞形态观察：每隔5代取出各组小瓶内长有细胞的小盖片。H-E染色。观察细胞的形态、生长和分裂变化。2BS细胞寿命观测：从第36代开始进行2BS细胞1∶2分种连续传代，直致细胞停止生长、分裂，14天后仍不能再分种传代为细胞传代寿命终止。2BS细胞生长速度与死亡率观测：取第44代细胞以6万个/mL细胞接种，接种后第2天始，每天取各组细胞进行活细胞计数，连续6天，取均值绘制细胞生长曲线图。另取瓶内长有细胞的小盖片，进行台盼蓝染色，观测细胞生长死亡的变化，绘制细胞死亡率图。细胞组化学成分的观察：取各组肝脏进行恒冷箱切片。Gomori改良法示ACPase，Fewgen反应示DNA；Glick法示ATPase。上述各组细胞化学成分，均采用Leitz-Mpv-2型显微分光光度计一区单波法进行定量测定。小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的观测：实验用雄性小鼠，平均体重20～25g，小鼠随机分3组，每组10只。加药组腹腔注射红景天素或人参茎叶皂苷，剂量均以大鼠体重计每天40mg/kg。同时设有给与相应量生理盐水的对照组。以吖啶橙染色，Nikon荧光显微镜观察巨噬细胞形态结构及其吞噬状态。H-E染色观测巨噬细胞吞噬率及吞噬指数。

（3）结果

① 对 2BS 细胞形态的影响相差显微镜和 H-E 染色观察　细胞呈梭形，清晰透明，呈束状或漩涡样规则走行。三组间无明显差异，传至第 14 代时，对照组细胞折光性差，细胞质内有细小颗粒堆积，分裂相减少，大细胞增多，细胞呈网格样不规则分布，而红景天、人参组的细胞形态、生长、走行均好于对照组。

② 2BS 细胞传代寿命的观测　红景天、人参组分别传到 61 代、59 代，对照组传至 47 代。红景天组比对照组延长 29.8%，人参组延长 25.5%代，前者比后者多传 2 代延长 3.3%代。

③.2BS 细胞生长速度及死亡率的测定结果　图 5-6、图 5-7 提示红景天、人参有促进细胞生长、增殖和降低细胞死亡率的作用。

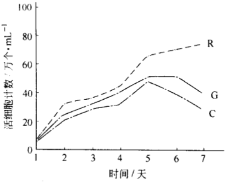


图 5-6　2BS 细胞生长速度曲线图
R—加药组（红景天）；G—加药组（人参）；C—对照组

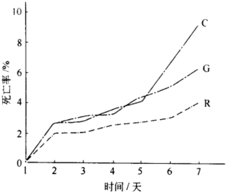


图 5-7　2BS 细胞死亡率变化折线图
R—加药组（红景天）；G—加药组（人参）；C—对照组

④ 肝细胞 ATPase，ACPase 和 DNA 的测定　采用 Leitz-Mpv-a 型显微分光光度计一区单波进行定量测定，均测定 40 个区域。

a. 肝细胞 ATPase　红景天组为 147.02±24.25，人参茎叶皂苷组为 70.08±9.63，对照组为 86.97±9.93。红景天组与对照组比有促进 ATPase 活性作用（$P<0.01$）。

b. 肝细胞 ACPase　红景天组为 74.82±13.83，人参茎叶皂苷 58.64±12.27，对照组为 159.09±25.83。结果揭示两组有显著抑制 ACP_{ase} 活性作用（$P<0.01$）。

c. 肝细胞 DNA 测定　红景天组为 70.40±58.83，人参茎叶皂苷为 59.24±5.79，对照组为 26.38，两组均有促进 DNA 合成作用。

⑤ 小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能测定　红景天、人参与对照组比，红景天、人参有显著促进巨噬细胞的吞噬功能（$P<0.01$）（表 5-43）。

【附】 红景天素是一种较强的抗氧化物质，具有明显抗退变抗老化作用。红景天素的抗老化效应略好于人参。

表 5-43　红景天和人参促进小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能

分　组	n	细胞数	巨噬细胞吞噬指数	巨噬细胞吞噬率
红景天素组	7	3500	1.54±0.22	77.14±9.91
人参茎叶皂苷组	7	3500	1.41±0.28	51.14±10.58
对照组	7	3500	0.41±0.21	27.29±8.36

注：$P<0.01$。

5. 石菖蒲

〖来源〗 本品为天南星科植物石菖蒲（*Acrous tatrinowii* Schott）的干燥根茎。

〖对消化系统影响作用测定〗

（1）材料　50%石菖蒲去油煎剂、0.53%石菖蒲总挥发油（3%吐温-80及蒸馏水配制）、0.37%β-细辛醚（3%吐温-80及蒸馏水配制）、0.24%α-细辛醚（3%吐温-80及蒸馏水配制）等4种受试药每毫升均相当于原生药0.5g；空白对照液由3%吐温-80及蒸馏水配制。以上5种受试药物均冰箱保存备用。

昆明种小鼠雄性雌性各半，体重（20±2）g。红眼大耳家兔雄性雌性各半，体重（2.0±0.5）kg。Wistar大鼠雄性雌性各半，体重（300±50）g。昆明种小鼠，体重（20±2）g。

（2）方法

① 对家兔离体肠肌的影响　参照离体肠肌标本实验法，待标本稳定后以二道生理记录仪描记一段正常收缩曲线，然后进行下列实验。共选用8段肠肌（取自不同家兔），重复实验。

对家兔离体十二指肠自发收缩的影响：在记录正常收缩曲线后，加入石菖蒲去油煎剂，使其在麦氏浴皿中的终浓度依次为0.5mg/mL、1.0mg/mL、2.0mg/mL、4.0mg/mL，观察并记录10～15min肠肌的收缩曲线。按下列公式求得受试药对肠肌收缩的抑制率。

$$抑制率=\frac{给药前收缩幅度-给药后收缩幅度}{给药前收缩幅度}\times 100\%$$

如上法，加入石菖蒲总挥发油、β-细辛醚及α-细辛醚或等容积的3%吐温-80，重复上述实验（表5-44）。结果表明：石菖蒲各提取部位（成分）对家兔离体肠肌自发收缩幅度均有一定的抑制作用，并有剂量依赖关系，去油煎剂、总挥发油、β-细辛醚、α-细辛醚的最低有效浓度依次为2.0mg/mL、5.3μg/mL、7.32μg/mL、2.40μg/mL。但4种提取部位（成分）对家兔离体肠肌自发收缩的频率的影响均不显著。

对乙酰胆碱（Ach）、磷酸组织胺（Hist）、氯化钡（$BaCl_2$）引起家兔离体肠肌痉挛性收缩的影响：方法同上。分别用Ach（1∶40000）、Hist（1∶

40000）、$BaCl_2$（1∶1000）引起家兔离体肠肌痉挛性收缩，待其收缩平稳后，分别加入石菖蒲各提取物并记录肠肌的收缩曲线。设痉挛收缩的幅度为 100%，计算石菖蒲去油煎剂等提取物对 3 种致痉剂作用的抑制百分率（表 5-45）。

② 对大鼠在体肠肌运动的影响　大鼠 30 只，随机分 5 组，1g/kg 乌拉坦麻

表 5-44　石菖蒲各提取部位（成分）对家兔离体肠肌自发收缩的抑制作用

组别	浓度 /$\mu g \cdot mL^{-1}$	抑制率/%	组别	浓度 /$\mu g \cdot mL^{-1}$	抑制率/%
去油煎剂	0	3.2±3.8	β-细辛醚	0	0.6±1.1
	500	9.7±5.0①		3.66	16.8±10.7②
	1000	17.8±4.7		7.32	36.2±18.9①
	2000	23.3±5.0②		14.64	47.1±15.1②
	4000	34.6±2.7②		29.28	64.4±14.2②
总挥发油	0	11.8±13.2	α-细辛醚	0	5.4±6.3
	5.3	42.4±13.7②		2.40	21.9±12.9②
	10.6	61.3±12.4②		4.80	41.7±18.8②
	21.2	77.2±11.7②		9.60	48.1±19.4②
	42.4	94.2±3.9②		19.20	64.7±15.9②

① 与空白对照组比较，$P<0.05$。②与空白对照组比较，$P<0.01$ 。

注：$n=8$。

表 5-45　石菖蒲各提取部分（成分）对家兔离体肠肌痉挛性收缩的抑制作用（$n=8$）

药物		致痉剂	抑制率/%			
空白对照		Ach	3.1±3.1	6.4±6.9	8.9±8.3	9.2±6.2
	抑制率/%	Hist	0.2±4.1	1.0±4.6	6.8±4.4	6.3±8.4
		$BaCl_2$	6.2±7.7	7.7±3.4	9.7±11.4	7.8±4.1
去油煎剂	浓度/$mg \cdot mL^{-1}$		0.5	1.0	2.0	4.0
		Ach	16.9±5.0②	27.0±10.9	45.1±13.9②	54.6±14.4②
	抑制率/%	Hist	16.6±7.8②	30.4±9.6②	43.8±14.6②	52.0±10.7②
		$BaCl_2$	19.7±11.0①	35.7±21.0②	44.0±20.2②	52.0±18.8②
总挥发油	浓度/$\mu g \cdot mL^{-1}$		5.3	10.6	21.2	42.4
		Ach	49.6±15.4②	71.0±14.8②	86.0±11.5②	95.6±3.0②
	抑制率/%	Hist	51.3±15.1②	75.8±11.4②	93.3±3.4②	98.3±1.1②
		$BaCl_2$	46.7±18.3②	70.5±12.5②	86.5±9.6	96.9±2.4②
β-细辛醚	浓度/$\mu g \cdot mL^{-1}$		3.66	7.32	14.64	29.28
		Ach	28.2±17.5②	49.3±24.6②	64.4±16.2②	76.3±11.8②
	抑制率/%	Hist	21.3±1.6②	36.7±2.0①	49.1±6.3①	72.0±17.7②
		$BaCl_2$	44.1±9.0②	58.5±2.8②	63.4±3.5②	76.0±15.3②
α-细辛醚	浓度/$\mu g \cdot mL^{-1}$		2.40	4.80	9.60	19.20
		Ach	38.3±16.2②	55.7±14.6②	68.2±10.2②	77.6±10.0②
		Hist	34.6±9.5②	53.2±16.8②	67.9±11.9②	75.5±10.7②
		$BaCl_2$	45.1±16.0②	62.5±12.8②	67.7±11.0②	81.0±8.2①

① 与相同体积的 3%吐温-80 空白对照液比较，$P<0.05$。$P<0.01$。

② 与相同体积的 3%吐温-80 空白对照液比较，$P<0.01$。

醉，沿腹正中线开 3cm 切口，找距回盲部 3～5cm 回肠一段，用肠固定管固定，并于肠管中点系一丝线连于张力换能器上，等肠肌稳定 20min 后，用二道生理记录仪描记一段肠肌正常收缩曲线，之后经十二指肠给受试药并描记给药后 30min、60min、90min 肠管蠕动曲线（图 5-8）。

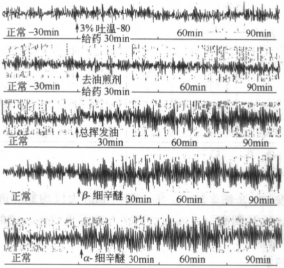


图 5-8 石菖蒲各提取部位对大鼠在体肠肌运动的影响

石菖蒲总挥发油、α-细辛醚、β-细辛醚、去油煎剂均能使大鼠在体肠管节律性蠕动不同程度地增强、张力增大，尤以 α-细辛醚的作用最显著。

③ 对在体小鼠小肠运动的影响　取禁食 12h 小鼠 60 只随机分成 5 组。以均含炭末 0.1g/mL 的 25%去油煎剂、0.26%总挥发油、0.18%β-细辛醚、0.12%α-细辛醚及空白对照液（3%吐温-80）灌胃给药 0.2mL/10g。30min 后脱颈椎处死，取从幽门至回盲部肠段，量其总长度及炭末推进长度，并计算炭末推进率。结果石菖蒲总挥发油、α-细辛醚及 β-细辛醚均能增加小鼠在体小肠炭末推进率，而去油煎剂作用则不明显（表 5-46）。

表 5-46 石菖蒲各提取部分对小鼠小肠炭末推进率的影响

组别	动物数/只	剂量/g·kg^{-1}	炭末推进率/%	组别	动物数/只	剂量/g·kg^{-1}	炭末推进率/%
空白对照	12	3%吐温-80	59.0±7.9	β-细辛醚	12	0.037	71.5±13.0①
去油煎剂	12	5	69.3±15.4	α-细辛醚	12	0.024	74.4±8.8①
总挥发油	12	0.053	69.1±10.2①				

① 与空白对照组比较 $P<0.01$。

④ 对大鼠胆汁分泌的影响　雄性大鼠 30 只随机分成 5 组。禁食 12h 后，用 1g/kg 乌拉坦麻醉，背位固定，沿腹中线切口约 2cm，找到胆总管，用头皮针插

入并结扎固定。同时十二指肠插管，留作给药用。待胆汁分泌稳定 20min 后，先收集用药前 30min 胆汁，然后十二指肠给药，收集用药后 0～30min，30～60min，60～90min 的胆汁，测量并记录胆汁流量，并计算给药后 30min 胆汁流量增加百分率（表 5-47）。

表 5-47　石菖蒲各提取部分（成分）对麻醉大鼠胆汁分泌的影响（$n=6$）

组别	剂量/g·kg^{-1}	胆汁流量/mL				胆汁流量增加百分率/%
		−30～0min	0～30min	30～60min	60～90min	
空白对照		0.27±0.03	0.22±0.03	0.21±0.02	0.20±0.03	0
去油煎剂	5	0.32±0.12	0.30±0.13②	0.28±0.12②	0.25±0.12②	0
总挥发油	0.053	0.27±0.03	0.37±0.05②	0.38±0.07②	0.33±0.07②	40.7
β-细辛醚	0.037	0.28±0.11	0.45±0.13②	0.44±0.15②	0.38±0.14①	60.7
α-细辛醚	0.024	0.28±0.10	0.46±0.10②	0.47±0.10②	0.41±0.08②	67.9

① 与空白对照组比较，$P<0.05$。

② 与空白对照组比较，$P<0.01$。

石菖蒲总挥发油、β-细辛醚、α-细辛醚对麻醉大鼠均能促进胆汁分泌，此作用在药后 30～60min 达到高峰，而去油煎剂没有促进胆汁分泌的作用。

【对记忆影响测定】

（1）材料　同上。

（2）方法

① 对小鼠学习和记忆获得能力的影响（跳台法）　用跳台法预选合格小鼠 55 只，体重（20±2）g，全雄性，随机分成 5 组，每组 11 只。分别灌胃受试药 0.2mL/10g，每日 1 次，连续给药 21 天。第 20 天以跳台法分别训练每只小鼠 1 次，24h 后开始测试并记录每组小鼠的跳下潜伏期（自跳台上跳下的时间）及 5min 内错误次数（表 5-48）。

表 5-48　石菖蒲各提取部位（成分）对正常小鼠学习和记忆获得能力的影响（$n=11$）

组别	剂量/g·kg^{-1}	跳下潜伏期/s	5min 内错误次数	组别	剂量/g·kg^{-1}	跳下潜伏期/s	5min 内错误次数
空白对照	同体积 3% 吐温-80	9.4±5.1	4.5±2.7	α-细辛醚	0.024	18.4±3.6②	1.8±0.8②
去油煎剂	5	16.8±13.0	2.0±0.8①	β-细辛醚	0.037	19.1±3.8②	1.7±0.8①
总挥发油	0.053	21.0±10.4①	1.6±0.7①				

① 与空白对照组比较，$P<0.01$。

② 与空白对照组比较，$P<0.001$。

② 对戊巴比妥钠造成记忆获得障碍的作用（电迷宫法）　取小鼠 66 只，体重 18～20g，全雄性，随机分成 6 组，每组 11 只，分别灌胃受试药 0.2mL/10g，每日 1 次，连续 21 天。第 21 天试验前 4h 再灌胃受试药 1 次，实验前 20min，灌胃戊巴比妥钠 15mg/kg，按电迷宫法训练小鼠 10 次。24h 后测试并记录每组

动物 10 次走迷宫的错误次数（表 5-49）。

表 5-49　石菖蒲各提取部位（成分）对戊巴比妥钠造成小鼠记忆获得障碍的影响（$n=11$）

组别	剂量/g·kg⁻¹	戊巴比妥钠/mg·kg⁻¹	错误次数	组别	剂量/g·kg⁻¹	戊巴比妥钠/mg·kg⁻¹	错误次数
空白对照	同体积 3%吐温-80	同体积 NS	3.3±1.7①	总挥发油	0.053	15	3.1±1.5①
				β-细辛醚	0.024	15	2.9±1.4①
模型	同体积 3%吐温-80	15	5.7±2.1	α-细辛醚	0.037	15	3.0±1.4①
去油煎剂	5	15	2.7±2.0①				

① 与模型组比较，$P<0.01$。

③ 对亚硝酸钠造成记忆巩固不良的影响（跳台法）　用跳台法预选合格小鼠 66 只，体重 18～20g，全雄性，随机分成 6 组，每组 11 只。灌胃受试药 0.20mL/10g，每日 1 次，连续给药 21 天。第 21 天给药 4h 后，每只小鼠以跳台法训练 1 次，之后立即皮下注射亚硝酸钠 120mg/kg，24h 后测试并记录跳下潜伏期及 5min 内错误次数（表 5-50）。

表 5-50　石菖蒲各提取部位（成分）对亚硝酸钠造成小鼠记忆巩固不良的影响（$n=11$）

组别	受试药/g·kg⁻¹	亚硝酸钠/mg·kg⁻¹	跳下潜伏期/s	5min 错误次数
空白对照	同体积 3%吐温-80	同体积 NS	107.3±18.4①	1.7±0.8②
模型	同体积 3%吐温-80	120	69.4±25.2	2.7±0.5
去油煎剂	5	120	97.5±32.7	1.8±0.9①
总挥发油	0.053	120	109.9±14.0①	1.6±1.1①
α-细辛醚	0.024	120	104.2±35.4①	1.08±1.0①
β-细辛醚	0.037	120	102.0±34.2①	1.7±1.0②

① 与模型组比较，$P<0.05$。

② 与模型组比较，$P<0.01$。

③ 与模型组比较，$P<0.001$。

④ 对乙醇造成记忆再现缺失的影响（跳台法）　取跳台预选合格小鼠 66 只，体重 18～20g，全雄性，随机分成 6 组，每组 11 只。给受试药同上。第 21 天给药 4h 后进行一次跳台训练，24h 后测试前 30min 灌胃 40%乙醇 0.1mL/10g，之后测试并记录跳下潜伏期和 5min 内错误次数（表 5-51）。

〖附〗　石菖蒲能直接抑制家兔离体肠肌自发性和致痉剂引起的痉挛性收缩，能兴奋大鼠在体肠管，使肠管节律性蠕动增强；促进小鼠肠管内容物的推进及促进大鼠胆汁分泌。石菖蒲上述生物效应的强度为：总挥发油＞α-细辛醚＞β-细辛醚＞去油煎剂。

石菖蒲的各提取部位（成分）对小鼠正常学习均有促进作用，对小鼠各种类

型记忆障碍模型均有不同程度的改善作用。其中以总挥发油、β-细辛醚、α-细辛醚作用最为明显。

表 5-51 石菖蒲各提取部位（成分）对乙醇造成记忆再现缺失的影响（$n=11$）

组别	剂量/g·kg⁻¹	40%乙醇/mL·10kg⁻¹	跳下潜伏期/s	5min 内错误次数
空白对照	同体积 3%吐温-80	同体积 NS	92.4±26.6③	2.1±0.9②
模型	同体积 3%吐温-80	0.1	32.4±37.2	6.1±4.2
去油煎剂	5	0.1	67.4±52.5	2.6±1.3①
总挥发油	0.053	0.1	80.9±43.7①	2.2±1.0②
α 细辛醚	0.024	0.1	70.2±39.5①	2.3±1.1②
β-细辛醚	0.037	0.1	71.4±38.6①	2.2±1.2②

① 与模型组比较，$P<0.05$。

② 与模型组比较，$P<0.01$。

③ 与模型组比较，$P<0.001$。

6. 黄花倒水莲

〖来源〗 本品为远志科植物黄花倒水莲（*Polygala aureocauda* Dunn）干燥根。

〖对凝血系统和血栓形成的影响测定〗

（1）材料 黄花倒水莲根，黄花倒水莲总皂苷（PTS，含量 56%），丹参注射液（DS，500mg 中药/mL）。

昆明种小鼠 18～22g，白色家兔 2.0～3.0kg，雌雄兼用。

（2）试剂 人纤维蛋白原（Fibrorase，中美合资上海莱士血制品有限公司，批号 2001121AO）；凝血酶（Thrombin，珠海生物化学制药厂，批号 2001070116）；乙酰水杨酸肠溶片（Asa，南京第二制药厂，批号 20011001）；角叉菜胶（Carrageenan，TypeⅠ，Sigma，C1013）等。

（3）方法

① 对家兔体外血浆复钙时间的影响 家兔心脏取血，分离血浆，取试管 5 支，每管加入混合血浆 0.1mL，分别加入 NS、PTS（0.75mg/mL，1.5mg/mL，3.0mg/mL）、丹参注射液各 0.1mL，随即放入 37℃ 水浴中温育 1min，分别加入 0.025mol/L $CaCl_2$ 溶液 0.1mL，混匀，仍放入 37℃水浴中，开始记时。1min 后每隔 15s 缓慢倾斜试管 1 次。记录自加 Ca^{2+} 至纤维蛋白形成、液面不动所需时间，即血浆复钙时间，重复 8 次。由表 5-52 可见，PTS 终浓度为 0.5mg/mL、1.0mg/mL 可显著、极显著延长家兔血浆复钙时间。

② 对凝血酶所致纤维蛋白凝固时间的影响 取试管 5 支，分别加入 1.8mL 0.1%人纤维蛋白原液和上述浓度药液 0.1mL，混匀后，37℃水浴预温 2min，再加入 4U/mL 凝血酶 0.1mL，加完后立即混匀计时，在 37℃下观察纤维蛋白原凝固情

况，记录凝固所需时间。重复 11 次。由表 5-53 可见，PTS 终浓度为 0.075mg/mL、0.150mg/mL 可显著、极显著延长凝血酶所致纤维蛋白凝固时间。

表 5-52　PTS 对家兔血浆复钙时间（PRT）的影响（$n=8$）

组别	溶液浓度 /mg·mL^{-1}	PRT/s	组别	溶液浓度 /mg·mL^{-1}	PRT/s
对照组	—	66.25±8.46		0.25	69.88±13.17
PTS	1.00	93.88±18.24②	DS	167.0	148.38±31.98②
	0.50	76.35±15.15①			

① $P<0.05$，与对照组比较；

② $P<0.01$，均与对照组比较。

表 5-53　对凝血酶所致纤维蛋白凝固时间的影响（$n=11$）

组别	溶液浓度 /mg·mL^{-1}	PRT/s	组别	溶液浓度 /mg·mL^{-1}	PRT/s
对照组	—	98.75±14.89		0.0375	110.30±14.55
PTS	0.1500	129.50±20.06②	DS	25.00	162.90±33.09②
	0.0750	114.80±11.96①			

① $P<0.05$，与对照组比较；

② $P<0.01$，与对照组比较。

③ 对家兔部分凝血活酶凝血时间的影响　制备家兔部分凝血活酶悬液，并分离家兔贫血小板血浆。取试管 5 支，加入部分凝血活酶悬液和血浆各 0.1mL，然后分别加入 PTS（1.5mg/mL、3.0mg/mL、6.0mg/mL）、丹参注射液各 0.1mL，混匀后于 37℃ 水浴中预温 2min，随即加入 0.025mol/L $CaCl_2$ 溶液 0.1mL，记录凝固时间。由表 5-54 可见，PTS 终浓度为 0.375mg/mL、0.75mg/mL、1.50mg/mL 可显著、极显著延长家兔部分凝血活酶凝血时间。

表 5-54　对家兔部分凝血活酶凝血时间（PTT）的影响

组别	溶液浓度 /mg·mL^{-1}	PTT/s	组别	溶液浓度 /mg·mL^{-1}	PTT/s
对照组	—	72.55±10.24		0.375	83.09±9.05①
PTS	1.500	102.27±12.36②	DS	125.0	108.73±15.63②
	0.750	93.27±14.92②			

① $P<0.05$，与对照组比较；

② $P<0.01$，与对照组比较。

④ 对凝血酶原时间的影响　取试管 5 支，加入凝血活酶、$CaCl_2$ 溶液各 0.1mL，分别加入上述药液 0.1mL，再加入兔血浆 0.1mL。混匀后放入 37℃水浴，开始记时。每隔 2～3s 缓慢倾斜试管 1 次。记录纤维蛋白凝固，液面不动所需时间。结果表明，PTS 对血浆凝血酶原时间无明显影响，各组平均值均在 8s 左右。

⑤ 对小鼠凝血时间的影响　取 18～22g 雌性昆明种小鼠 50 只，禁食 12h

后，随机分为5组，每组10只，分别灌胃给予阳性对照药Asa(50mg/kg)、PTS (12.5mg/kg、25.0mg/kg、50.0mg/kg）及等容量蒸馏水（0.2mL/10g)，给药1h后采用毛细管法测定凝血时间。由表5-55可见，PTS 25.0mg/kg 、50.0mg/kg极显著延长小鼠凝血时间。

表5-55 对小鼠凝血时间（CT）的影响

组别	给药剂量/mg·kg⁻¹	CT/s	组别	给药剂量/mg·kg⁻¹	CT/s
对照组	—	70.3±14.8	对照药Asa组	12.5	81.1±18.2
PTS	50.0	108.4±27.7①		5.0	108.7±11.2①
	25.0	117.4±33.9①			

① 与对照组比较，$P<0.01$。

⑥ 对角叉莱胶致小鼠足跖肿胀及血栓形成的影响 PTS 50mg/kg可显著抑制注射角叉莱胶1h的足跖肿胀，3个剂量组对注射角叉莱胶3h、5h的足跖肿胀均有显著或极显著的抑制作用（表5-56，表5-57）。小鼠注射角叉莱胶后24h左右，尾部出现淤血、变黑，形成暗红色血栓区。对照组黑尾率90%，并维持至72h，PTS 50.0mg/kg对血栓形成率无明显影响，但对已形成血栓长度有显著抑制作用，PTS 12.5mg/kg、25.0mg/kg亦有抑制趋势。

表5-56 对角叉莱胶致小鼠足跖肿胀的影响

组别	给药剂量/mg·kg⁻¹	足肿胀/mm		
		1h	2h	3h
对照组	—	0.707±0.100	0.924±0.134	0.819±0.177
PTS	50.0	0.552±0.160①	0.563±0.144②	0.499±0.078②
	25.0	0.639±0.095	0.597±0.189②	0.511±0.151②
	12.5	0.649±0.253	0.602±0.100②	0.623±0.142①
对照药Asa组	50.0	0.605±0.203	0.527±0.139②	0.463±0.134②

① $P<0.05$，与对照组比较；

② $P<0.01$，与对照组比较。

表5-57 对角叉莱胶致小鼠血栓形成的影响

组 别	给药剂量/mg·kg⁻¹	血栓形成率/%	血栓长度/mm	已形成血栓长度抑制率/%
对照组	—	90	22.78±8.06	
PTS	50.0	90	15.11±6.37①	45.6
	25.0	70	17.57±4.72	36.8
	12.5	80	18.25±6.30	34.4
对照药Asa组	50.0	90	11.56±7.49②	54.8

① $P<0.05$，与对照组比较；

② $P<0.01$，与对照组比较。

【附】 PTS可明显延长体外家兔血浆复钙时间，显著延长凝血酶所致纤维

蛋白凝固时间及部分凝血活酶凝血时间，体内给药可显著延长小鼠凝血时间，而对血浆凝血酶原时间无明显影响。PTS 50mg/kg 对小鼠血栓形成率无明显影响，但对已形成血栓长度有显著抑制作用。

7. 桃仁

【来源】本品为蔷薇科植物桃 *Prunus persica*（L.）Batsch 及山桃 *P. davidiana*（Carr.）Franch. 的种仁。

【抗血栓活性测定】

（1）材料　桃仁，阿司匹林肠溶片，ADP（Sigma公司）；昆明种小鼠（体重20g±2g），Wistar 大鼠（200g±20g）。

（2）仪器　BT-873 型实验性体内血栓形成测定仪；毛细玻管（内径 0.9～1.1mm，壁厚 0.10～0.15mm）。

（3）方法

① 样品的制备　将桃仁粉碎颗粒直接装入回流提取器中，用石油醚（沸点为 30～60℃）、乙酸乙酯、无水乙醇、水依次回流提取，每种溶剂分别提取 3 次，每次回流 2h 合并 3 次滤液，蒸馏回收溶剂，最后得到各组分提取物，分别计算得率，配制大、小鼠所需浓度各组分样品，其中石油醚提取物配制成乳剂（乳化剂为吐温-80，脂肪油：乳化剂：水＝1：0.8：7.2），乙酸乙酯提取物用 0.5％的羧甲基纤维素钠配成混悬液，其余两组配制成水溶液，混合组为 4 种溶剂提取物样品按等体积混合得到的混合物，残渣粉末组系上述 4 种溶剂提取后的最终剩余残渣过 60 目筛后的水溶液。阿司匹林用 0.5％的羧甲基纤维素钠配成混悬液。

② 对小鼠凝血时间的影响　昆明种小鼠 80 只，随机分成 8 组（表 5-58），各给药组按表 5-58 剂量分别灌胃给药，正常对照组灌服生理盐水，阳性对照组灌服阿司匹林 80mg/kg，每日一次，连续 7 天。末次给药 1h 后，用玻璃毛细管插入小鼠眼内眦球后静脉丛。深 4～5mm，轻轻转动再退回，至血液流入管内开始计时，血液注满后取出毛细管，隔 30s 折断毛细管约 0.5cm，并缓慢向左右拉开，观察折断处是否有血凝丝，至血凝丝出现为止，所历时间即为血凝时间。给药组与对照组作组间比较（*t* 检验），结果见表 5-58。桃仁的乙酸乙酯提取物能显著延长小鼠的凝血时间。

表 5-58　对小鼠凝血时间的影响（$n=10$）

组　别	剂量/$g \cdot kg^{-1}$	凝血时间/s	组　别	剂量/$g \cdot kg^{-1}$	凝血时间/s
正常对照组	—	94.6±29.2	水组	0.39	121.6±44.4
石油醚组	1.07	121.2±41.6	混合组	0.51	125.6±43.8
乙酸乙酯组	0.15	145.6±53.0①	残渣粉末组	1.37	106.2±34.2
无水乙醇组	0.41	97.8±33.4	阿司匹林组	0.08	145.9±26.7①

① 与正常对照组相比，$P<0.05$。

③ 对 ADP 诱导的小鼠急性肺栓塞的影响　昆明种小鼠分组及给药同上。末次给药 1h 后，分别尾静脉注射 ADP 生理盐水液（200mg/kg），小鼠随即发生呼吸喘促，不能自主活动时，记录注射诱导剂后至小鼠呼吸正常，四肢恢复自主活动所需时间。给药组与对照组作组间比较（*t* 检验）。结果：桃仁的乙酸乙酯提取物、无水乙醇提取物均能缩短 ADP 诱导血小板聚集所致肺栓塞引起的呼吸喘促时间（表 5-59）。

表 5-59　对 ADP 诱发的小鼠急性肺栓塞的影响（$n=10$）

组别	剂量/g·kg⁻¹	恢复正常呼吸及自主活动的时间/s	组别	剂量/g·kg⁻¹	恢复正常呼吸及自主活动的时间/s
正常对照组	—	232.8±95.4	水组	0.39	161.4±58.0
石油醚组	1.07	208.3±94.8	混合组	0.51	208.7±80.4
乙酸乙酯组	0.15	128.6±56.3①	残渣粉末组	1.37	201.2±93.9
无水乙醇组	0.41	125.9±46.5①	阿司匹林组	0.08	112.2±34.1①

① 与正常对照组相比，$P<0.01$。

④ 对电刺激大鼠血栓形成的影响　Wistar 大鼠随机分成 8 组，按表 5-60 所示剂量灌胃给药，每日一次，连续 7 天。末次给药 1h 后，分离大鼠一侧颈总动脉，用 2mA 电流刺激颈总动脉，刺激时间为 2min，引起血管内膜损伤，激活血小板和凝血系统，致使颈动脉血管内逐渐形成混合血栓。当颈动脉血管内因血栓形成而堵塞血流时，则血管远端温度突降。用温度传感器监测血管表面温度，通过仪器自动报警，记录从刺激开始到温度突降所需时间，称为堵塞时间（*OT*），即血栓形成时间。给药组与对照组作组间比较（*t* 检验）：桃仁的乙酸乙酯组、混合组、粉末组能显著延长大鼠血栓形成时间（表 5-60）。

表 5-60　对电刺激大鼠颈总动脉血栓形成的影响（$n=8$）

组　别	剂量/g·kg⁻¹	血栓形成时间/s	组　别	剂量/g·kg⁻¹	血栓形成时间/s
正常对照组	—	363.3±37.2	水组	0.30	430.1±106.6
石油醚组	0.76	435.0±47.6	混合组	0.37	466.8±90.8②
乙酸乙酯组	0.12	466.2±54.8②	残渣粉末组	1.03	463.6±54.9②
无水乙醇组	0.31	340.1±20.3	阿司匹林组	0.04	442.1±80.6①

① 与正常对照组相比，$P<0.05$。

② 与正常对照组相比，$P<0.01$。

【附】 桃仁的乙酸乙酯提取物能明显延长小鼠凝血时间，明显缩短尾静脉注射 ADP 所致的小鼠肺栓塞呼吸喘促时间，并能延长电刺激大鼠颈总动脉血栓形成的时间。实验剂量范围内桃仁的乙酸乙酯提取物在抗血栓作用方面较为显著。

8. 水蛭

【来源】 本品为水蛭科动物蚂蟥 *Whitmania pigra* Whitman 的全体。

〖抗凝活性测定〗

(1) 材料　水蛭；Wistar 大鼠，雄性，体重18.0～22.0g。

(2) 仪器　LG PABER-1 型血小板聚集凝血因子分析仪。

(3) 试剂　枸橼酸钠，戊巴比妥钠（>95%），凝血酶时间（TT），凝血酶原时间（PT），活化的部分凝血活酶时间（APTT）。

(4) 方法

① 样品液的制备　样品粗粉先后用 8 倍量、6 倍量、4 倍量无水甲醇回流提取 3 次，合并 3 次提取液，减压浓缩至无甲醇，加蒸馏水溶解，分别用正己烷、乙酸乙酯、正丁醇萃取，剩余为水溶液部分。回收正己烷、乙酸乙酯、正丁醇、水，可得水蛭的四部分提取物，分别称取 0.05g，正己烷、乙酸乙酯、正丁醇三部分提取物均溶于 1mL 二甲亚砜中，水溶液部分溶于 1mL 生理盐水中，即得四种样品溶液（0.05g/mL）。

② 凝血酶原时间（PT）和凝血酶时间（TT）的测定　将大鼠用戊巴比妥钠麻醉，腹静脉取血，3.8%枸橼酸钠抗凝（1∶9），混匀后离心 15min（3000r/min），取上清液，分离出贫血小板血浆（PPP）。取 PPP 100μL，加入药液 10μL，预温 5min 后加入预温 15min 的 TT 试剂，用血小板聚集凝血因子分析仪测定凝固时间。

③ 活化的部分凝血活酶时间（APTT）的测定　按上述方法分离出贫血小板血浆（PPP），取 PPP 100μL，加入 10μL 药液和 100μL APTT 试剂，预温 5min 后加入预温 15min 的 $CaCl_2$ 100μL，用血小板聚集凝血因子分析仪测定凝固时间。

(5) 结果　见表 5-61，表 5-62，表 5-63，表 5-64，表 5-65，表 5-66。水蛭乙酸乙酯部分能使大鼠的 PT、TT、APTT 显著延长，水溶液部分能显著延长 PT 和 APTT，正己烷部分能显著延长大鼠的 PT，正丁醇部分能显著延长大鼠的 APTT。水蛭正己烷部分抗凝作用明显逊于乙酸乙酯部分，有极显著性差异（$P<0.01$）。

表 5-61　水蛭水溶液部分对大鼠 PT 实验的影响（$n=5$）

组　别	凝血酶原时间/s
生理盐水组	13.47±1.30
水溶液部分	15.10±1.03①

① 与生理盐水组比较，$P<0.05$。

表 5-62　水蛭正己烷部分、乙酸乙酯部分、正丁醇部分对大鼠 PT 实验的影响（$n=5$）

组　别	凝血酶原时间/s	组　别	凝血酶原时间/s
二甲亚砜组	14.73±1.56	乙酸乙酯部分	22.89±2.99①
正己烷部分	16.43±1.60①	正丁醇部分	16.02±1.22

① 与二甲亚砜组比较，$P<0.01$。

表 5-63　水蛭水溶液部分对大鼠 TT 实验的影响（$n=5$）

组　别	凝血酶时间/s
生理盐水组	32.80±5.55
水溶液部分	39.71±10.66

表 5-64　水蛭提取液Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ对大鼠 TT 实验的影响（$n=5$）

组　别	凝血酶时间/s	组　别	凝血酶时间/s
二甲亚砜组	46.51±4.18	乙酸乙酯部分	57.96±4.17①
正己烷部分	43.83±4.26	正丁醇部分	48.75±3.70

① 与二甲亚砜组比较，$P<0.05$。

表 5-65　水蛭水溶液部分对大鼠 APTT 实验的影响（$n=5$）

组　别	活化的部分凝血活酶时间/s
生理盐水组	25.11±2.31
水溶液部分	29.64±3.99①

① 与生理盐水组比较，$P<0.05$。

表 5-66　水蛭提取液Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ对大鼠 APTT 实验的影响（$n=5$）

组　别	活化的部分凝血活酶时间/s	组　别	活化的部分凝血活酶时间/s
二甲亚砜组	32.77±4.44	乙酸乙酯部分	35.82±6.95①
正己烷部分	29.80±4.79	正丁醇部分	35.00±5.37①

① 与二甲亚砜组比较，$P<0.05$。

【附】 凝血过程是一系列的酶促反应，包括内源性、外源性凝血系统和共同途径。凝血酶原时间（PT）、凝血酶时间（TT）、活化的部分凝血活酶时间（APTT）的测定，分别反映了外源性凝血系统和内源性凝血系统的活性。

参　考　文　献

1 毕开顺等. 中药质量评价方法的研究. 见：中国药学科学发展战略与新药开发［M］. 上海：第二军医大学出版社，1995

2 陈奇. 中药药理研究方法学［M］. 北京：人民卫生出版社，1999：505～507

3 陈小夏等. 广藿香胃肠道药理作用［J］. 中药材 1998，21（9）：462～466

4 陈奇. 中药药理研究方法学［M］. 北京：人民卫生出版社，1993

5 吴锦梅等. 黄连解毒汤对胃肠道影响的实验研究［J］. 中药药理与临床，1994，（2）：8

6 朱忠勇. 临床医学检验［M］. 上海：科学出版社，1978：345

7 张明法等. 氧前胡素的抗腹泻作用［J］. 中草药，1996，27（12）：727

8 江苏新医学院. 中药大辞典［M］. 上海：上海科学技术出版社，1996. 2079

9 李萍，钟鸣，邱翠娥. 黄花参抗衰老作用的初步探讨［J］. 云南中医药杂志，1995，16（4）：13～15

10 范秀珍. 黄花倒水莲口服液抗过氧化脂质的测定［J］. 中医药研究，1998，14（2）：

35～36
11 郭建功，李钟文，金竹秋等. 黄花倒水莲对实验性动物心肌功能的影响 [J]. 湖南中医学院学报，1992，12 (3)：40～42
12 秦华珍，夏新华，李钟文. 黄花倒水莲多糖的抗应激作用 [J]. 广西中医药，1996，19 (3)：52～54
13 李梨平，王伟华. 黄花倒水莲对乙肝病毒 E 抗原体外抑制作用的初步观察 [J]. 湖南中医药导报，1998，4 (10)：32～33
14 黄胜光，陈新宇. 黄花倒水莲治疗高脂血症 30 例临床观察 [J]. 湖南中医杂志，1999，15 (3)：6～8
15 李丽，朱丹妮，严永清. RP-HPLC 法测定黄花倒木莲中两种黄酮的含量. 中国药科大学学报，2002，33 (1)：42～44
16 刘峻，徐宏江，朱丹妮. 黄花倒水莲中 Tenuifilin 的毛细管电泳分析 [J]. 中国药科大学学报，2002，33 (5)：412～415
17 寇俊萍，马仁强，朱丹妮等. 黄花倒水莲水提液的活血、抗炎作用研究 [J]. 中药材，2003，26 (4)：268～271
18 陈奇. 中药药理研究方法学（第 1 版）[M]. 北京：人民卫生出版社，1993，485～617
19 胡三觉，田巧莲，顾建文等. 一种新的体内血栓形成动物模型 [J]. 中华血液学杂志，1993，14 (10)：541～542
20 药用动物编写组. 中国药用动物志 [M]. 天津：天津科技出版社，1979. 82
21 贾元印等. 水蛭中抗凝血物质的提取及药理实验 [J]. 山东医药工业，1990，9 (1)：13
22 明・李时珍. 本草纲目（校点本）下册. 北京：人民卫生出版社，1982. 22864
23 欧长兴等. 水蛭素的研究概况 [J]. 中国药学杂志，1991，26 (7)：396
24 程秀娟等. 脑血管扩张剂——尼莫地平、硝苯吡陡和长春胺对大鼠和小鼠记忆障碍的改善作用 [J]. 药学学报，1986，21 (10)：731
25 韩怡凡等. 樟柳碱及其他胆碱能药物对小鼠空间分辨学习和记忆的影响 [J]. 中国药理学报，1983，4 (4)：220
26 张钧田等. 十二种化学药品破坏小鼠被动回避性行为——跳台试验和避暗法试验的作用比较观察 [J]. 药学学报，1986，21 (1)：12
27 胡锦官等. 石曹蒲及其有效成分对消化系统的作用 [J]. 中药药理与临床，1999，15 (2)：16
28 倪京满，赵汝能，王锐. 中药天门冬炮制前后氨基酸含量比较.（无杂志名）
29 赵中杰，汇佩芬，李昂. 中药牡蛎中碳酸钙、微量元素和氨基酸的测定 [J]. 中国海洋动物杂志，1991，37 (1)：11～14
30 张莅峡，郭育芝，刘泓，孙刚. 中药水蛭中的微量元素和氨基酸的分析 [J]. 沈阳药学院学报，1991，8 (3)：172～175
31 陈绥清，王强，龚孙莲等. 中药枸杞中的氨基酸分析. 中国药科大学学报，1991，22 (1)：53～55
32 宋洪涛，郭涛，张跃新等. 中药红曲中氨基酸和脂肪酸的分析. 中国药房，1999，10

(5)：231～232

33 杨晓鸿，刘银燕，赵然等．中药薤白炮制前后无机元素与氨基酸的含量分析 [J]．白求恩医科大学学报，1997，23 (5)：472～474

34 刘焱文，陈树和，刘生友．中药鳖甲及两种炮制品的氨基酸营养学．氨基酸杂志，1993，(1)：16～17

35 刘训红，王春根，喻向华．蛤蚧及其伪品的等电点鉴别 [J]．中药材，1991，14 (10)：24～25

36 刘瑞贵，吕福祥，高恩东等．鹿角胶与其伪品的等电点研究 [J]．中成药，1996，18 (5)：19～20

37 陈秋林，姚成．中药薄荷草中氨基酸的测定 [J]．南京体育学院学报（自然科学版），2003，2 (4)：60～62

38 贾天柱，周鹤，解世全等．中药狗脊及其炮制品中氨基酸和总糖的比较分析 [J]．中成药，2000，22 (10)：700～701

（李仁伟，陆景珊，张贵君）

第六章 细胞生物学鉴定法

细胞生物学鉴定法主要是采用染色体（chromosome）的核型分析技术对中药进行鉴定。

中药某个特定种群的生物体细胞中染色体的形态、组型、带型是稳定不变的，代表着该种群的基本遗传特征，根据该特征即可以鉴定中药的品种。由于染色体形态只能在细胞分裂的中期、后期观察，故本方法只适用果实和种子类中药的鉴定，尤其适用中药的基原鉴定。本法根据染色体的排列制成核型模式图；或用“不对称核型分类”标准确定其核型，并与染色体的背景资料比较，达到鉴定的目的。

第一节 基本理论

真核细胞在细胞分裂间期或分裂期能被碱性染料染色的物质统称为染色质或染色体。这是1882年弗莱明（Flemming）在研究细胞核分裂中首次发现并提出的。染色质（chrornatin）与染色体（chromosome）二者并不存在组分上的差异，而是在细胞周期中不同时期构型上的不同，由此，二者在功能上存在很大差异。染色质一旦经折叠和卷曲环绕成染色体，其中的DNA则全无转录活性。但染色体的存在形式对有丝分裂或减数分裂非常重要，这也正是染色体的功能。

一、染色质的组构

（一）概述

在细胞遗传学上，通常将染色体处于最大伸展状态的间期染色质分为常染色质（euchromatin）和异染色质（heterochromatin）。常染色质是指细胞分裂间期或分裂期染色质（体）上染色较浅的区域，是具有遗传活性的区域，是具有转录功能的染色质，是在细胞分裂间期和分裂期之间由于其螺旋化程度使包装发生周期性变化的染色质。与此相反，异染色质是染色质（体）上染色很深的区域，是不具有遗传活性、无转录功能的染色质，是在整个细胞周期中凝缩程度变化较小的染色质。异染色质又分为结构性异染色质和功能性异染色质。结构性异染色质是高度重复的DNA区段，如着丝粒、端粒、随体DNA等。通过原位杂交检测，标记的卫星DNA往往位于有丝分裂染色体着丝粒周围的异染色质上。这类区段基本无结构基因、无遗传活性，呈惰性状态。而功能性异染色质是不同细胞类型

或不同发育阶段表现出的异染色质化的常染色质，它们有处于钝化状态的结构基因。这类染色体或区段在一定条件下可以从异染色质状态转变为常染色质，也可以从常染色质状态转变为异染色质。例如，雌性哺乳动物其中一条 X 染色体则为随机失活的功能性异染色质。

1976 年，Ris 按染色质功能状态分为活性染色质（active chromatin）和非活性染色质（inactive chromatin）。活性染色质是指有转录功能的染色质，主要分布于常染色质区。这类染色质螺旋化程度低，染色浅。而非活性染色质是指无转录功能的异染色质或处于细胞分裂期的染色体。这类染色质或染色体呈高度螺旋化状态，染色深，其基因是关闭的。

由此可见，分裂间期染色质是以核小体（nucleosome）为基本结构单位串联而成。每一核小体约含 200bp DNA 和 4 种组蛋白各两个分子组成的八聚体蛋白质核心。这 4 种组蛋白是富含赖氨酸的组蛋白 H2A、H2B 以及在进化上非常保守的富含精氨酸的组蛋白 H3、H4。第 5 种组蛋白 H1 附着在核小体之间，连接 DNA 外侧。该染色质纤维直径 10nm，在细胞分裂期几经螺旋和卷曲，最后以包装比（packing ratio）约为 10000 的比率组装成染色体。

（二）染色质的蛋白组分

染色质中的蛋白质主要是组蛋白和非组蛋白。组蛋白（histones）在染色质中是一组带正电荷的碱性蛋白质，其总量约与 DNA 相等。根据组蛋白所含赖氨酸与精氨酸之比，在真核细胞中可将组蛋白分为 5 种类型，即 H1、H2A、H2B、H3 和 H4（表 6-1）。

表 6-1　真核细胞组蛋白成分比较

组蛋白	碱性氨基酸/%		酸性氨基酸/%	碱性氨基酸与酸性氨基酸之比	分子质量/D
	赖氨酸	精氨酸			
H1	26	1	5	5.4	23000
H2A	11	9	15	1.4	13960
H2B	16	6	13	1.7	13774
H3	10	13	13	1.8	15342
H4	11	14	10	2.5	11282

此外，在鸟类与两栖类有核红细胞非转录活性染色质中还发现第 6 种富含赖氨酸的组蛋白 H5。这些组蛋白与带有负电荷的 DNA 分子结合，构成染色质一系列颗粒状初级结构。在真核生物进化过程中，组蛋白的氨基酸变化很小，这种保守性表现在不同种属的组蛋白与 DNA 之间，组蛋白与组蛋白之间，以及组蛋白与非组蛋白之间的相互作用都具有一定的相似性。

组蛋白 H3 和 H4 是富含精氨酸的蛋白质，也是已知进化上最保守的真核细胞蛋白质。在其氨基酸序列上很少有组织和物种间差异。特别是 H4，其氨基酸

序列在猪、牛和大鼠中竟完全相同。在牛和豌豆如此远缘的物种中其 H3 只有 4 个氨基酸的差异，而 H4 也只有 2 个氨基酸的差异。这种氨基酸序列的保守性表明，这种蛋白质的功能在生物有机体中是重要的，同时也表明，这种功能在不同的种属中是相同的，进而说明真核细胞染色质都有一个共同的基础结构。

H2A、H2B 是富含赖氨酸的蛋白质，也是真核细胞中变化较小的组蛋白。但其氨基酸序列在种属间有明显差异，其改变多发生在氨基端。

在染色质中的另一种组蛋白是极富含赖氨酸的 H1 组蛋白。它在种属甚至在个体组织之间表现出氨基端及残基端的差异。H1 组蛋白是碱性最强的蛋白质，但可用稀盐溶液从染色体中分离获得。

在细胞周期中，处于高度凝缩状态的染色体与处于脱螺旋伸展状态的染色质的组蛋白含量基本相同。但组蛋白随着细胞生长会发生周期性的乙酰化、甲基化及磷酸化的化学修饰作用。如乙酰化和甲基化发生在组蛋白氨基端的赖氨酸 ε-氨基上，这些修饰能中和氨基酸侧链的正电荷，减弱组蛋白氨基端区域的碱性。若组蛋白的乙酰化和甲基化发生在细胞周期的染色质复制及组蛋白合成的 S 期，则表明这些修饰可能与核小体的形成有关。组蛋白的磷酸化发生在各组蛋白丝氨酸和苏氨酸的羟基上，尤以 H1 组蛋白更敏感。这种修饰多发生在细胞周期间期的晚期，细胞的磷酸化可达最高水平。在有丝分裂结束后，其磷酸化下降到其峰值的 20%以下。由此表明，H1 的磷酸化与染色质高级结构的形成有关。

在染色质蛋白组分中，除组蛋白以外的所有蛋白质称非组蛋白。它们是一群种类繁多、数量微小、在组织和种属间有很大差异的蛋白质，是与基因表达和染色质的高级结构有关的一些功能蛋白。它们包括：①DNA 多聚酶、RNA 多聚酶以及聚合过程中所需的酶；②维持染色质和染色体结构的蛋白质，如有丝分裂中期的骨架蛋白；③影响染色质构象和基因活性的蛋白质，如高活动性组分（high mobility group，HMG），在染色小体中发现并与 H1 相结合的 HMG1、HMG2 可能与核小体向高级结构的转变有关，并在核小体核心颗粒中还发现与基因活性有关的 HMG14、HMG17。④一些与基因调节有关的因子，如在 RNA 多聚酶精确转录卵母细胞 5S RNA 基因时所必需的 TFⅢA 因子等。

（三）核小体的组构

当把细胞分裂间期核置于低离子强度溶液中时，它们由于低渗而膨胀破裂并释放出电镜可见的呈“串珠”状染色质。串珠为每一颗粒直径为 11nm、高为 5.5nm 的楔状体，外绕 DNA 双螺旋，有规律地沿着 2.0nm 的 DNA 分子排列着，这些颗粒则称核小体（nucleosomes），它们是组成染色质的基本单位。实验表明，当用微球菌核酸酶（micrococcal nuclease）处理染色质后，再用凝胶电泳分析可得到 10 多条区带，且每一区带中 DNA 片段长度都是其区带中最短 DNA 片段长度的整倍数。这最短 DNA 片段长度就是核小体单体，所含 DNA 单位长

度约为 200bp。其余各区带则为二聚体、三聚体、四聚体等。核小体单体沉降系数约为 11S，分子质量约为 250～300kD，蛋白质与 DNA 质量比约为 1.25。

经进一步研究发现，当在 0℃加入少量醇的条件下，用微球菌核酸酶处理染色质，则该酶能将核小体之间连接 DNA 切断产生核小体单体，所含 DNA 长约为 200bp。若在 37℃用大量微球菌核酸酶处理染色质，则该酶不仅能将核小体之间连接 DNA 切断，而且能消解酶切点两端的 DNA 链，最终形成只含 146bp DNA 的核心颗粒（core partcle）。其过程是：核小体（200bp＋八聚体＋H1）→染色小体（166bp＋八聚体＋H1）→核小体核心颗粒（146bp＋八聚体）。可见，组蛋白保护了核小体核心部分 146bp 的 DNA 免遭酶的降解。所以核小体的基本组构是，核心部分有 146bp 双链 DNA，在组蛋白八聚体，即（H2A、H2B、H3、$H4)_2$ 上盘绕 1.75 圈，每圈约 80bp，核心颗粒之间连接 DNA 长 60bp，其中靠近核心部分约 23bp 附有在化学结构上有物种特异性和组织特异性的单个分子的 H1 组蛋白结合在“进”、“出”核心颗粒的 DNA 两端封闭盘绕的 DNA。在各组蛋白中，有约 80％的氨基酸组成的肽链呈 α 螺旋，并且许多伸展的 α 螺旋位于 DNA 双螺旋的大沟中，从而使组蛋白中带正电荷的赖氨酸和精氨酸与 DNA 中带负电荷的磷酸基团通过静电引力维持核小体结构的稳定。所有真核细胞核小体结构和功能的这种恒定性，表明组蛋白的保守性。尤其是 H3 和 H4 组蛋白在不同物种中组构的高度保守性说明它们在核小体结构中起着重要作用。

核小体单体 DNA 双螺旋长度通常为 200bp，但在不同物种、不同组织、不同发育时期，甚至同一细胞基因组的不同部分也有不同程度的变异。如真菌为 154bp、海胆精子细胞为 260bp、海胆原肠胚细胞为 220bp 以及同一真核细胞基因组的卫星 DNA 与 5S RNA 基因的核小体 DNA 链的长度也不同，但其平均值通常在 180～200bp 之间。结构研究表明，虽然种属间、组织间等核小体单体 DNA 链长度有不同程度的差异，但其核心部分 DNA 链的长度都恒定在 146bp，所变化的只是核小体间的连接 DNA 部分。

目前，作为核小体核心的组蛋白八聚体既可以在微球菌核酸酶的作用下从染色质中抽提获得，也可以把 4 种分离提纯的组蛋白在溶液中混合，在逐渐提高盐浓度的条件下进行体外联合而成。组蛋白八聚体也能在低浓度盐溶液中解离，先失去一个 H2A · H2B 二聚体，产生组蛋白六聚体，然后再失去另一个 H2A · H2B 二聚体，剩下 $H3_2H4_2$ 四聚体。八聚体的解离次序似乎表明，核小体的组构形式是以一个 $H3_2H4_2$ 四聚体为核心，以马蹄形结构使 DNA 形成一中心圈，两个 H2A · H2B 二聚体则分别排列在四聚体两侧，使在四聚体平面上下各进一步盘绕约半圈的 DNA 稳定下来与 DNA 一定部位相结合，并由 H1 组蛋白封闭进出核小体的 DNA，从而构成完整的核小体。

核小体中八聚体的组蛋白与组蛋白之间交联分析也阐明，H2A 和 H2B 的 C

末端与其蛋白质中心部分 H3、H4，尤其是 H4 和 DNA 链的核小体核心部分相互紧密缔合，从而加强了核小体核心颗粒稳定性的作用。实验表明，若去掉 C 末端会导致其热稳定性下降和 DNase Ⅰ 消化率的增加，特别是增加核心颗粒 DNA5′端的降解。而 H2A 和 H2B 结合成两个二聚体，其每一蛋白质的 N 末端与连接 DNA 相连。两个 H3 通过其氨基酸序列中心部分内的半胱氨酸以二硫键相连，并与两个 H4 结合成四聚体以马蹄形结构使 DNA 形成一个中心圈，并沿着两侧的 H2A · H2B 二聚体上下进一步盘绕 0.75 圈，这是核小体核心部分的主要交联结构。H1 是单分子的大分子组蛋白，其中心部分位于核小体核心颗粒边缘附着于进出核小体核心颗粒 DNA 链的两端，起封闭核小体核心结构的作用（图 6-1）。同时它以 N 端和 C 端参与核小体螺线管的形成，保持染色质高级结构的稳定，并以其球状中心的保守区束缚每一核小体的核心部分，对保护染色质小体 166bp 不被核酸酶降解起着重要作用。

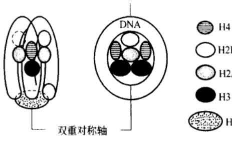


图 6-1　核小体组构模型

电镜观察表明，在细胞周期间期的染色质可见到两种纤维：一种在低离子强度（<20mmol/L NaCl）溶液中，在无 H1 参与下，其纤维以直径 11nm 的单个核小体线状排列的形式存在，这种串珠结构，称细纤维；另一种是在高离子强度（200mmol/L NaCl）溶液中，在 H1 参与下，其纤维在单链线状核小体纤维的基础上以每周 6 个核小体，盘绕成直径 30nm 的螺线管结构，称粗纤维。经电镜 J 射线、中子散射研究认为：核小体螺线管结构的这种粗纤维是间期染色质的主要结构。有关从核小体螺线管纤维到组装成染色体有两种结构分析：一种是 1986 年 Taniguchi 等用扫描电镜发现的 30nm 的螺线管经进一步盘绕成直径为 200nm 的超螺线管，而超螺线管再经盘绕最终形成直径 600nm 的染色体。可见，由 DNA 到染色体经历了下列过程。

双螺旋（0.2nm）$\xrightarrow{\text{缩短到 1/7}}$核小体纤维（11nm）$\xrightarrow{\text{缩短到 1/6}}$螺线管纤维（30nm）$\xrightarrow{\text{缩短到 1/40}}$超螺线管纤维（200nm）$\xrightarrow{\text{缩短到 1/5}}$中期染色体（600nm）

DNA 分子经 4 级螺旋盘绕最终缩短到原长近万分之一。由于这 4 级的演变都是通过螺旋化实现的，而称多级螺旋模型（multiple coiling model）。另一种结构分析是，1977 年 Laemmli 等用 2mol/L NaCl 处理 HeLa 细胞中期染色体，除去组蛋白和大部分非组蛋白后，在电镜下观察到由非组蛋白构成的染色体骨架（scafold）和由骨架伸展出无数 30nm DNA 侧环，呈放射状环绕在骨架结构周

围。环的基部在染色体或染色单体的中央集中并与非组蛋白的轴相连，这就是非组蛋白骨架与放射环模型（NHP scafold and radial loop model）。到目前为止，该模型尚缺乏形成过程的详细解释，但两种结构分析，其 DNA 最终都缩短近万分之一，形成光学显微镜下可见的染色体。

（四）活性染色质

1. 活性染色质对 DNase Ⅰ 的敏感性

在真核细胞的 DNA 复制与转录过程中，活性染色质区的一个重要标志是对 DNase Ⅰ 的敏感性。这是由于处于开放伸展状态活性染色质结构中的核 DNA 较之处于更致密盘绕状态非活性染色质结构中的核 DNA 更易受到 DNase Ⅰ 攻击。检测染色质 DNA 对 DNase Ⅰ 敏感性的常用方法是用组织匀浆器破碎细胞，离心分离细胞核，把样品分成几份，用剂量递增的 DNase Ⅰ 水解，从各样品中提取 DNA 并用限制性内切核酸酶消化，然后对 DNA 制备物再进行凝胶电泳、Southern 印迹，并把活性和非活性两个基因的克隆 DNA 用放射性标记成探针 1 和探针 2 杂交，在电泳凝胶中分析 DNA 限制酶切片段的位置。在用剂量递增的 DNase Ⅰ 处理的各制备物中，若它们的限制酶切片段用探针 1 标记，受标记片段的量在各制备物中没有变化，而用探针 2 标记同样的 DNA 制备物时，若受标记的限制酶切片段的量随着 DNase Ⅰ 处理剂量的增加而减少甚至消失，则表明受探针 2 标记的染色质 DNA 是有转录活性的染色质 DNA 片段，因此对 DNase Ⅰ 是敏感的。而受探针 1 标记的 DNA 片段是无转录活性的染色质 DNA 片段，所以表现出对 DNase Ⅰ 的抗性。例如，从鸡红细胞提取的染色质，其中 β-珠蛋白基因是活性基因，其限制性片段随着加入 DNase Ⅰ 浓度的增加而很快消失，而卵清蛋白基因失去活性，其片段只显现轻微正常的降解。可见，核中大部分染色质因含不表达基因则对 DNase Ⅰ 表现较大的耐受性。有人发现染色质中有转录活性基因区比无转录活性基因区对 DNase Ⅰ 敏感性大约增加 25 倍，其敏感区范围至少包括一个活性转录单位，但其结构变化却远远超过这一范围。如鸡的 β-珠蛋白基因簇敏感区向该基因簇 5′端延长 6000～7000bp，而向 3′端延长 8000bp，用代表全部细胞 mRNA 的 cDNA 探针实验表明，所有活性基因无论强弱都对 DNase Ⅰ 敏感，但敏感程度不同。说明不同活性基因对 DNase Ⅰ 的敏感性是可转录基因的一种特性，而并非由于转录活动所致。用极微量的 DNase Ⅰ 消化染色质，发现在敏感区内活性基因 5′端启动区上游有对 DNase Ⅰ 的超敏感区（hypersensitive region）。该区通常簇集在没有核小体的区域，这可用间接末端标记技术定位这些超敏感部位，即用 DNase Ⅰ 特异性酶切活性染色质的超敏部位，提取 DNA，再用限制性酶切。然后将双重酶切产物进行电泳并用与限制部位相连区域的探针杂交，这样用探针鉴别一端被限制酶切，而另一端被 DNase Ⅰ 酶切的独特片段可从形成的电泳区带中分辨出来。从 DNase Ⅰ 超敏部位到限制酶切点的距离即为该片

段长度。实验表明，许多超敏部位与活性基因顺序有关，其酶切位置位于或靠近转录单位5′端上游，这是各活性基因的共性。例如，果蝇唾腺核DNA中，为胶质蛋白编码用途的基因的转录，有5个超敏部位已被定位在其基因5′侧启动区上游和该结构基因中（－480bp、－405bp、－330bp、－70bp和＋30bp），其中－405bp和－330bp是两个主要的超敏部位。果蝇的两个缺失突变种Ber品系和Orl品系是不表达结构基因的天然变种。Ber品系缺失部位是最远端的－480bp和－405bp的超敏部位，其特征是结构基因不表达不产生胶质蛋白。经进一步实验证明，该缺失突变种不但消除了缺失部位的超敏位置，而且未缺失部分的超敏位置也随之消失。说明最远端部位是起始转录不可缺少的部位，也是改变相距约500bp的染色质结构所必需的。而Orl品系缺失－330bp的超敏部位，其Sgs4基因可出现正常的1%～3%的转录量。该品系只是消除其缺失范围内的超敏部位。可见，上述这些超敏部位是以不同的方式影响转运时基因的表达。这些超敏部位的DNA区可能是核小体已被顺序专一的调节蛋白所展开的无核小体区，从而改变tDNA结构使之对DNaseⅠ特别敏感。

2. 活性染色质中的非组蛋白作用

非组蛋白也是染色质中一类重要蛋白质，其种类繁多，可达500多种。用2mol/L的NaCl溶液或硫酸葡萄糖加肝素处理Hs细胞中期染色体去掉组蛋白和大部分非组蛋白后，在电镜下观察到仍维持中期染色体基本形态的骨架。在骨架上可见到许多长45～90kb无超螺旋结构的环。经分析发现，骨架是染色质的非组蛋白，它对中期染色体的结构起稳定作用。

染色质经不同浓度三氯醋酸处理后，可获得高活动性组分（high mobility group，HMG）和低活动性组分（low mobility group，LMG）两种非组蛋白，其中HMG非组蛋白含25%酸性氨基酸和25%碱性氨基酸并富含赖氨酸。经对兔胸腺细胞核小体的研究证实，核小体含HMG1、HMG2、HMG14和HMG17四种非组蛋白。其中HMG14和HMG17结合于核小体的核心颗粒上，而HMG1和HMG2则类似于组蛋白H1的功能，参与维持染色质的高级结构。

若鸡红细胞染色质经DNaseⅠ消解，可使HMG14和HMG17两种非组蛋白从染色质中释放出来。除去两种非组蛋白，则红细胞染色质的珠蛋白基因对DNaseⅠ的敏感性随之丧失。但当把这两种非组蛋白或纯化的HMG14和HNG17再与上述染色质混合，则珠蛋白基因对DNaseⅠ的敏感性也随即恢复。又如，当强转录基因或弱转录基因加入1mol/L HMG14或HMG17时，都可使该基因赋以对DNaseⅠ的敏感性。而且通过微球菌核酸酶处理所分离出的核小体单体也具有对DNaseⅠ的敏感性。当把其中的HMG14和HMG17非组蛋白除去时，该效应随即消失，若重新放入则该效应即刻恢复。用核小体核心颗粒重复上述实验其结果相同。由此表明，非组蛋白HMG14、HMG17是导致染色质对

DNase Ⅰ敏感性的重要原因之一。然而，另据实验指出，用脑组织细胞中的染色质做同样处理，其珠蛋白基因对 DNase Ⅰ 的敏感性不变。说明 HMG14 和 HMG17 非组蛋白对无转录活性的基因则不起作用。前后实验似乎表明，HMG 非组蛋白与活性染色质对 DNase Ⅰ 的敏感性有相关关系，但不是导致染色质对 DNase Ⅰ 敏感性的惟一原因。

经对纯化的 HMG14、HMG17 非组蛋白层析实验证明，这两种非组蛋白有选择性地结合于有乙酰化组蛋白及低甲基化核小体有转录活性的基因顺序上，从而显现出对特异核小体上的特异 DNA 链有一定结合特异性。说明 HMG14、HMG17 对活性染色质的识别，涉及它们对核小体各组分的亲和力以及核小体各组分的化学修饰作用。如组蛋白乙酰化酶、DNA 甲基化酶等非组蛋白对核小体组蛋白的乙酰化及 DNA 链的低甲基化的修饰作用，而间接改变活性染色质形态，使活性基因得以转录。

3. 活性染色质的基因表达与甲基化关系

5-甲基胞嘧啶（m^5C）是真核细胞 DNA 中 C 残基常见的甲基化碱基，约占 DNA 胞嘧啶总量的 2%～7%。大多数甲基存在于 CG 二联体中，DNA 中甲基化的 CG 频率在不同的物种和组织中不同，其变化范围在 20%～80%之间。这种二联体的二核苷酸是自身互补的。所以，当发生甲基化时，往往在 DNA 的两条链上都出现甲基化，即：$\begin{array}{l}5'\cdots{}^{m}CpG\cdots3'\\3'\cdots GpC^{m}\cdots5'\end{array}$，而仅在一条链上甲基化的二联体称半甲基化（hemimethylated）。

限制性内切核酸酶 *Hpa* Ⅱ 和 *Msp* Ⅰ 都能识别四核苷酸的 CCGG 序列。但限制酶 *Msp* Ⅰ 能切割所有 CCGG 有甲基化和无甲基化序列，而限制酶 *Hpa* Ⅱ 只能切割未甲基化的 CCGG 四聚体。所以，可用这两种限制酶检查 DNA 中甲基化的分布。当用 *Hpa* Ⅱ 和 *Msp* Ⅰ 时分别消化完全未甲基化的 DNA 时，则所得到的限制酶切片段有同样的电泳图谱。而当用这两种限制酶分别消化有甲基化也有未甲基化的 DNA 时，则会观察到限制酶切片段不同的电泳图谱（图 6-2）。故可用 *Msp* Ⅰ 鉴别 DNA 中所有 CCGG 序列的分布，而 *Msp* Ⅰ 可用来确定有甲基化部位。

实验表明，DNA 甲基化状态是随基因表达的变化而变化，在表达发生变化的基因特定位置上也同时发生甲基化和去甲基化作用。如非洲爪蟾 rRNA 基因中多数 CG 部位在所有情况下都保持甲基化状态，但位于启动区的两个部位在 rRNA 基因开始转录表达的胚胎发育时期则变成去甲基化。又如在成人的造血红蛋白细胞中，胚胎基因的失活伴随着胚胎基因 5′侧启动区上游甲基化程度的增加以及该区超敏部位的消失。而在胚胎的造血红蛋白细胞中，在活性转录表达的胚胎基因内及附近也观察到 CG 位置的低甲基化及其对 DNase Ⅰ 的敏感性。上述

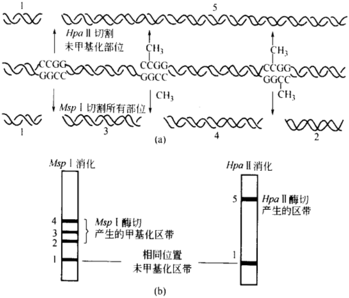


图 6-2 (a) 限制酶 *Hpa* Ⅱ 和 *Msp* Ⅰ 切割部位及
(b) *Hpa* Ⅱ 和 *Msp* Ⅰ 酶切片段凝胶电泳图谱比较

实验表明，甲基化基因是钝化基因，而未甲基化基因是活性基因。然而，早期胚胎细胞 H2 组织相容性基因当它们完全甲基化时也可以表达，似乎是被甲基化激活的。可见基因表达与甲基化关系尚需进一步探讨。

在体细胞 DNA 复制中，两条互补链特定部位都是甲基化的 C^{m5}CCGG 序列，在半保留复制后产生的 DNA 分子中只有原来本链是甲基化的，呈半甲基化状态。然而真核细胞所具有的维持甲基化酶（maintenance methylase）能立即识别半甲基化部位，把甲基加到新合成链未甲基化的胞嘧啶上，使两个半甲基化的子代双链体转变成完全甲基化状态。

进一步研究认为，甲基化状态可能以两种方式失去。脱甲基酶除去甲基或复制产生的半甲基化部位不再发生甲基化，而在下一次复制产生的两个 DNA 分子之一就会完全失去甲基。实验表明，在通常情况下，甲基化能导致基因失活，而去甲基化可导致基因表达，这一点在 5-氮胞苷实验中也得到证实。

二、染色体的组构

1. 着丝粒

在细胞的有丝分裂或减数分裂期间，染色体的向极移动取决于中心粒发出的纺锤丝附着在染色体着丝粒部位的牵引。所以，着丝粒是染色体的主要组构，是

负责染色体分离的重要结构。

据报道，经对啤酒酵母着丝粒 DNA 的进一步研究发现，染色体的分离是由于着丝粒区 DNA 序列的作用，即任何具有该序列的 DNA 分子在分裂时染色体能正常运动，而缺乏该序列的 DNA 分子则不能起分离作用。采用基因工程方法把几种酵母着丝粒（CEN）断片克隆在酵母质粒中，发现它们之间序列的同源性可以鉴别出 3 个保守区，而显现出共同的特征（图 6-3）。

```
CEN3 ATAAGTCACATGATGATATTTGATTTTATTATATTTTTAAAAAAAGTAAAAAATAA
     TATTCAGTGTACTACTATAAACTAAAATAATATAAAAATTTTTTTCATTTTTTATT
     Ⅰ

AAAGTAGTTTATTTTTAAAAAAATAAAATTTAAAATATTAGTGTATTTGATTTCCGAA
TTTCATCAAATAAAAATTTTTTATTTTAAATTTTATAATCACATAAACTAAAGGCTT
Ⅱ 88bp(93%A+T)                                        Ⅱ
```

图 6-3 几种由酵母着丝粒区 DNA 序列同源性的 3 个保守区序列

如图 6-3 所示，着丝粒区 DNA 序列组分Ⅰ是 14bp 序列，该序列在各着丝粒之间有所差异。组分Ⅱ是由 82～89bp 组成，其中富含 AT 碱基对达 90%以上，在所测的各着丝粒上都含长度相当的这种序列。其组成很像高等真核生物的某些卫星 DNA。组分Ⅲ是 11bp 序列，该序列是相当保守的序列，存在于各着丝粒之中并几乎完全同源，最多只相差一个碱基。经分析，这些着丝粒区 DNA 序列均无任何可译读码。实验表明，组分Ⅰ及组分Ⅲ对着丝粒的功能起着主要作用。

另据证实，将酵母一染色体着丝粒断片取代另一染色体的着丝粒，而后重新引入酵母细胞，其结果与原着丝粒功能相同，说明着丝粒是通用的。当引入的着丝粒断片置换了染色体着丝粒后，若从着丝粒断片上除去着丝粒 DNA 序列的保守区，则该染色体如无着丝粒断片不能分离。由此证明，着丝粒断片携带着丝粒功能信息，该信息就是着丝粒区 DNA 序列。

2. 端粒（telomre）

在所有染色体上，另一个重要组构是端粒（telomre）。其功能是封闭染色体末端，防止非活性 DNA 末端降解以及染色体之间融合，保证染色体的稳定性。

通过研究几种低等真核生物（四膜虫、草履虫、纤毛虫、鞭毛虫、酵母等）染色体的端粒发现，所有这些端粒都有一些共同特征，都是由一线状 DNA 分子在其末端以 $5'C_n\ (A/T)_m\ 3'$（$n>1$，$m=1\sim4$）短小序列为单位串联重复组成。例如，四膜虫染色体 rDNA 其末端 100～200bp 是由串联的 5′CCCCAA3′序列为单位重复组成。在重复单位中还有一些缺少第一个 C 而形成的单链间歇的非连续性特殊序列，其外端碱基可能以发夹状封闭，故不能被核酸酶识别，而免遭连

接酶的封口作用。实验表明，四膜虫 rDNA 线性 DNA 分子末端序列可置换酵母天然端粒，除在酵母中可复制外，还可在酵母中起端粒作用。说明在一些物种中端粒之间具有共同序列，其末端的简单串联重复序列可能对提供复制性及末端稳定性上起着重要作用。

综上所述，染色体存在的基本条件是具有适宜的端粒以保证其复制性和稳定性，具有着丝粒以维持其分离性，以便在细胞分裂中复制了的染色体均等地分配到两个子细胞中。为了进一步研究染色体的结构与功能，从 1982 年起人们开始研究人造染色体。现在人们已成功地构建成能在酵母细胞中精确复制并在细胞分裂时能均等地分配到两个子细胞中去的人造微小染色体（artificial minichromosome）。人造微小染色体是在质粒上插入克隆化标记基因、酵母着丝粒 DNA、复制起始点以及两个融合端粒（图 6-4）。由于克隆化标记基因其基因产物能使细胞呈桃红色，不含人造染色体及其标记基因的细胞呈红色，而含两个人造染色体两份基因拷贝的细胞呈白色，以此可以鉴别人造染色体在细胞中的复制、分离、分配情况。

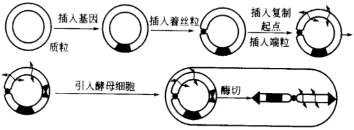


图 6-4　人造染色体构建

人造染色体只有长于 20～50kb 时才稳定。若长为 50kb 时子细胞呈桃红色的正确分离率可达 98.5%，若长为 100kb 时其正确分离率可达 99.7%。可见染色体的总长度是正确分离的关键因素，其原因尚需作进一步探讨。

第二节　染色体分析

染色体分析及其多态性研究，通常都采用有丝分裂中期染色体，因为这一时期染色体经历 4 级螺旋盘绕已达到高度的凝集状态。每种生物的染色体数目和形态已经恒定，是最易识别和区分便于分析与研究的时期。而其他时期，要么观察不到适宜长度，而无法分析；要么染色体数目太多，加之一些染色体的多线性有很多侧枝，而不易区分研究。因此，有丝分裂中期染色体是核型分析、带型分析、多态性研究的最佳时期。但是对于少数短染色体物种采用粗线期研究分析效果较好。

一、核型分析与带型分析

染色体是生物性状世代传递的遗传信息载体。在有丝分裂中期，每种生物体细胞成对存在的染色体数目和形态都是恒定的（表 6-2），其中一半来自父方，另一半来自母方。所以生物体细胞具有两组染色体，称为二倍体（$2n$），而其生殖细胞染色体只为体细胞一半，具有一组染色体，称为单倍体（n）。不同种生物不但染色体数目不同，其形态也不同。因此，根据每对同源染色体着丝粒位置，可将染色体分为中央着丝粒（m）、亚中央着丝粒（sm）、亚端部着丝粒（st）和端部着丝粒（T）4 种类型。人们把所制备的中期分裂相染色体根据其大小、着丝粒位置进行同源染色体配对、大小排列、编组，则构成核型（karyotype）。所以，核型是正常二倍体生物的一个体细胞完整的一套中期染色体排列成对的集合，它代表一个物种正常体细胞的特征。

表 6-2 主要畜禽体细胞染色体数目

种名	学名	染色体数	种名	学名	染色体数
猪	*Sus scrofa* var. *domesticas*	38	驯鹿	*Ragifer tarandus*	14
黄牛	*Bos taurus*	60	兔	*Oryctolagus cuniculus*	44
瘤牛	*Bos indicus*	60	猫	*Felis domestica*	38
牦牛	*Poephagus grummiens domes*	60	鸡	*Gallus gallus*	78±
绵羊	*Ovis aries*	54	鸭	*Anas domes*	80±
山羊	*Capra hircus*	60	鹅	*Anser domestica*	80
马	*Equus caballus*	64	鹌鹑	*Coturnix japonica*	78±
驴	*Equus asinus*	62	鸽	*Columba liva*	80±
双峰驼	*Camelus bactrianus*	74	火鸡	*Meleagris gallopavo*	80±
犬	*Canis familiaris*	78	珠鸡	*Numida meleagris*	78±

把所制备的中期分裂相染色体经不同显带处理构成核型后，再进行遗传分析，则称为核型分析（karyotype analysis）和带型分析（baning pattern analysis）。

例如，根据所制备的猪的中期分裂相染色体可分为 A、B、C、D 4 组。A 组 1～5 号，有 5 对成员，是具有亚中央着丝粒的染色体；B 组 6 号、7 号，有 2 对成员，是仅次于 2 号染色体大小具有亚端部着丝粒的染色体；C 组 8～12 号，加上一对性染色体，共 6 对成员，是具有中央着丝粒的染色体，其中 X 染色体大小相当于 8 号染色体，呈异固缩状态的 Y 染色体是最小的中央着丝粒染色体；D 组 13～18 号，有 6 对成员，是具有端部着丝粒的染色体（图 6-5）。

为了进一步研究每一染色体，可用显带技术使中期分裂相染色体显现不同带型在 G 带、C 带、R 带等，以便与正常有带核型及无带核型比较，对各对染色体进行带型分析（图 6-6、图 6-7）。

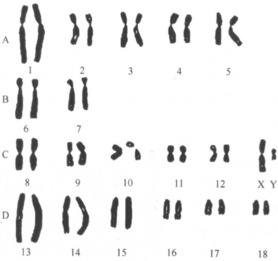


图 6-5　正常公猪核型



图 6-6　正常公猪 G 带核型

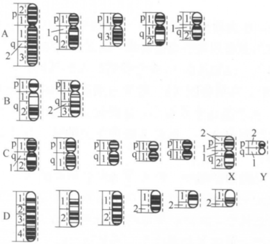


图 6-7　正常公猪 G 带模式图

二、核型标记

对核型分析中的核型标记，是根据 1973 年巴黎会议对人类及家畜显带核型标准第一次国际会议所统一规定的标准进行标记。首先记载所制备的动物细胞染色体的数量，其次注明性染色体组成。例如，正常公猪核型标记为 38，XY；正常母猪核型标记为 38，XX；正常公牛核型标记为 60，XY；正常母牛核型标记为 60，XX。在带型标记上，如公猪 lq35，即表示公猪 1 号染色体长臂 3 区第 5 带纹；10p16，即表示公猪 10 号染色体短臂 1 区第 6 带纹（图 6-7）。如果在带中还有分带，则用小数点后面数字表示。

若常染色体畸变，则在性染色体组成后面注明畸变类型及畸变染色体号码、部位，若在 p 或 q 上角写＋或－，则表示畸变染色体短臂或长臂部位增加或缺失，如猪的核型：38，XY，rcp（$6p^+$；$14q^-$），则表示该公猪其 6 号染色体短臂与 14 号染色体长臂相互易位，使 6 号染色体短臂增加，14 号染色体长臂缺失；38，XY，t rcp（$11p^+$；$15q^-$），则表示该公猪其 11 号染色体短臂与 15 号染色体长臂发生相互易位，使 11 号染色体短臂增加，15 号染色体长臂缺失；38，XX，rob（13/17），则表示该母猪 13 号染色体与 17 号染色体发生罗伯逊易位。

三、性染色体分析

一般来说，当细胞处于分裂间期至前期时，核内染色体呈伸展状态。但是雌性哺乳动物性染色体中的一条 X 染色体，由于处于功能性异染色质状态而异常凝缩成小体附着在核膜上，则把该凝缩的小体称为 X-染色质体、X-小体或 Barr 小体。这种 X-染色质体显现在正常雌性哺乳动物 XX 细胞中，而不显现在正常雄性 XY 细胞中。

然而在禽类中，作为同型配子的 ZZ 型雄性体细胞中并未观察到呈凝缩状态的 Z-染色质体，说明起着剂量补偿机制的一条 Z 染色体在雄性中并未相应失活。

在鸡 Z 染色体上，已知具有 15 个性状的巨大连锁群。例如，棒眼形成基因（B）、银羽基因（S）、快羽基因（k）等都可用在雏鸡的性别决定上。性连锁隐性矮小基因（dw）由于能使个体矮小，从而提高产蛋鸡和肉用仔鸡、种母鸡的饲养效率。有人曾经测定公鸡、母鸡 Z 染色体上的这些性连锁基因，但并未发现剂量补偿的证据。

另据报道，在马骡和驴骡中，因来自马和驴亲本的 X 染色体很易区分，所以其晚复制的 X 染色体也很易检测。经研究表明，晚复制的 X 染色体像失活染色体。在失活的染色体中，来自驴亲本的 X 染色体比来自马亲本的 X 染色体失活率高。显然在这些杂种中 X 染色体失活不是随机的。

在畜禽中，雌雄嵌合体是一种普遍现象，虽然不多见但并不罕见。嵌合体有

同源嵌合体（mosaic）和异源嵌合体（chimera）两种。同源嵌合体多是有丝分裂异常造成的，而异源嵌合体则往往是双精入卵、极体受精或两个合子融合的结果。据报道，一头核型为38，XX雌雄嵌合体猪，其90%细胞为XX型，10%细胞为XY型，而在解剖学上却是一个发育不全的雄性。另一头核型为38，XY的猪，检测42个细胞为XY型，4个细胞为XX型并有80%以上神经细胞具有X-染色质体。另据报道，一核型为39，XXY的公猪，其形态类似于雌雄异源嵌合体，但后来发现该猪6%细胞是具有两个X-染色质体的一头XXY/XXXY雌雄同源嵌合体。有关类似报道，如38，XX/38，XY；38，XX/38，XY/37，XO；38，XX/38，XY，80%XY等雌雄异源嵌合体现象。

在牛中，雌雄嵌合现象也时有发生。据报道，一头小公牛的12.35%细胞是61，XYY型；1.68%细胞是59，XO型的雌雄同源嵌合体。另一例，60，XY/61，XXY/59，XO的雌雄同源嵌合体公牛，其后裔小牛犊中23%性腺发育不全，是60，XY/60，XX/59，XO的雌雄同源嵌合体。另据报道，一头小母牛是XX/XY/XXY的雌雄异源嵌合体，所培养的表皮细胞是XX/XXY型，且少数细胞有易位染色体。另一例，在71头小母牛中发现2头在两个相继繁殖季节未怀孕的59，XO/60，XX/61，XXX和59，XO/60，XX/61，XO雌雄同源嵌合体。有人研究一头同源嵌合体XY/XYY荷兰公牛精液和综合繁殖力特征发现，该公牛一侧是隐睾产生精液量比正常的少，但受孕率比正常的高。9个父系半同胞和11个女儿都有正常的核型并没有异常特征。在其淋巴细胞中XYY细胞对XY细胞的比率随着年龄在1岁时的48%减少到5岁时的11%。在表皮和肾细胞培养中发现逐步丢失XYY细胞，但脾细胞的171天第29次培养却仍保持其起始比率。人们在异性双胞胎两者的淋巴细胞及肾、肺、骨髓、结缔组织和性腺细胞培养中也发现60，XX/60，XY的雌雄异源嵌合体。从而联想到，此类公牛在其精原细胞中若有XX型细胞，则与正常的60，XY公牛相比具有X染色体精子数量将会增加，其后代雌牛频率就会增高。已报道，一头在它的48个后代中雌性小牛占71%，另一头在它的168个后代中78%是小母牛，出现在性比上明显偏向雌性的偏离现象。但也有很多异源嵌合体公牛在性比上没有很大偏离。

此外，在牛中还发现X染色体和常染色体的易位。经淋巴细胞培养所有细胞都表现出一条13号染色体片段含两个G带的端粒部分接到一条X染色体的短臂上。该小母牛除X染色体与常染色体易位外，还有其父畜所具有的1/29易位。对该小母牛使用各种自然或人工授精交配，在第12次授精时怀孕，雄胎牛足月流产，未显现任何异常现象。对雄胎牛的成纤维细胞培养表明，其核型为59，XY，t rob (1/29)，并表现出正常的性染色体。对小母牛的淋巴细胞进行培养并用^{3}H标记，检测50个细胞总发现正常的X染色体迟复制。后来有人用同样材料研究600多个细胞具有相同结果。这些细胞与在其他物种中所研究的X

染色体重排的情况是一致的。这可能是 X 染色体和常染色体的易位妨碍了正常 X 染色体随机失活，所以当易位于 X 染色体的常染色体片段像其他常染色体一样同步起始合成并扩展整个易位染色体时，应该失活而没有失活的正常 X 染色体则迟复制。

在绵羊和山羊中发现有雌雄异源嵌合体现象。已报道许多有关绵羊 54，XX/XY 的异源嵌合体，经细胞学研究，其淋巴细胞为 XX/XY 异源嵌合型，而其表皮细胞或其他器官的组织培养均未发现 XY 细胞。

在马中也有许多有关雌雄同源嵌合体（63，XO/64，XX；63，XO/65，XYY）和雌雄异源嵌合体（64，XX/64，XY；64，XX/65，XXY；65，XXY/63，XO）的报道，这些嵌合体往往是不育的。

1971 年，Minnesota 实验室 Abdel-Harmeed 等曾检测出 2A-ZZ/2A-ZW 和 2A-ZW/3A-ZZZ 两个成活的雌雄异源二倍体和混倍体的鸡，它们具有雌雄间体的表型和无功能的生殖腺。

四、染色体多态性

1. 染色体数目多态性

当一个体体细胞所具有的染色体数目是单倍体的倍数时，则称该个体为整倍体。所以，整倍体包括单倍体（n）、二倍体（$2n$）、三倍体（$3n$）和多倍体。通常把三倍体以上的称为多倍体。

据报道，在成鸡以及低等脊椎动物成体中已发现三倍体和四倍体个体。而多倍性和单倍性已在人、牛和脊椎动物很多物种的早期胚胎、睾丸组织及淋巴细胞培养中发现，但除鸡以外还没有发育到成体的报道。1963 年，Ohna 曾发现 3A-ZZZ、3A-ZZW 活的三倍体成鸡。1974 年，Bloom 曾检测出 4A-ZZZZ 和 4A-ZZWW 的鸡胚。1981 年，Fechheimer 曾对 16 只孵化 16～18h 的鸡胚进行染色体检查，发现 5.2%胚胎核型异常，其中 81%为单倍体和多倍体。对各种实例的研究结果表明，单倍体是精子异常的产物，而多倍体是卵子异常的产物。由于卵子形成过程中的减数分裂异常或卵子的老化，造成减数分裂受阻、延迟受精或多精入卵，从而形成染色体倍性的多态性。

当一个体体细胞所具有的染色体数目不是该物种单倍体的确切倍数时则称该个体为非整倍体，通常用 $2n\pm x$ 表示。这是第一次或第二次减数分裂异常的结果。动物个体非整倍性变异有很多相关报道，特别是性染色体非整倍性变异（表 6-3）。

在家畜家禽中，有关常染色体的非整倍性变异报道较少，但检测猪、牛、绵羊、禽的胚胎常染色体非整倍性等异常现象比率也很高。1977 年 Herzog 等曾发现三倍性牛，经显带检测是 17 号染色体三体（61，XY，17AAA）。后来也有相

表 6-3　畜禽性染色体非整倍性变异

种名	性染色体类型	主要表型效应	种名	性染色体类型	主要表型效应
猪	37,XO	间性、卵巢发育不全	马	63,XO	卵巢发育不全
	39,XXY	睾丸发育不全		65,XXX	不育
牛	61,XXX	子宫小,卵巢发育不全		65,XXY	隐睾
	61,XXY	睾丸发育不全		66,XXXY	间性,隐睾,内生殖器雌性
绵羊	55,XXY	睾丸发育不全	鸡	79±,ZZZ	两侧睾丸均产精子
				79±,ZZW	间性

继三体性报道。经观察，牛的三体性（$2n+1$）都表现出短颌，因而把这种表型特征称为致死短颌三体性综合征（lethal brachygnahia trisomy，LBTS）。后经进一步对各种细胞检测发现，所谓三体性并不是100%细胞都是三体。

2. 染色体结构多态性

在家畜中，常见的染色体结构多态性主要是易位、NOR多态性、C带多态性和Y染色体多态性。

易位中的相互易位在猪、牛、羊中尤为突出。从表6-4可见，几乎猪的所有染色体间都可以发生相互易位。研究表明，这种相互易位的结果使每窝产仔数减少并可增加仔猪早期死亡。所以这一类型的染色体畸变是使猪繁殖力降低的主要原因。

表 6-4　猪染色体的相互易位

易位类型	品　种	资料来源
t rcp($1p^-$;$6q^+$)	大白猪	Locniskar 等,1976
t rcp($1p^-$;$8q^+$)	瑞典约克夏	Gustavsson 等,1983
t rcp($1p^-$;$11q^+$)	瑞典长白猪	Hansen 等,1970
t rcp($1p^+$;$15q^-$)	芬兰长白猪	Kuokkanen 等,1988
t rcp($1p^+$;$7q^-$)	瑞典长白猪	Gustavsson 等,1985
t rcp($1p^-$;$16q^+$)	法国长白猪	Forster 等,1981
t rcp($1p^-$;$11q^+$)	芬兰长白猪	Kuokkanen 等,1988
t rcp($3p^+$;$7q^-$)	大白猪	Popescu 等,1983
t rcp($4p^+$;$14q^-$)	大白猪×法国长白猪	Popescu 等,1979
t rcp($4p^+$;$13q^-$)	芬兰长白猪	Makinen 等,1986
t rcp($5p^-$;$14q^+$)	英国长白猪×杜洛克猪	Popescu 等,1984
t rcp($5p^-$;$8q^+$)	瑞典约克夏	Gustavsson 等,1984
t rcp($6p^+$;$15q^-$)	比利时长白猪	Bouters 等,1974
t rcp($6p^+$;$14q^-$)	大白猪×艾塞克斯	Madan 等,1978
t rcp($7p^-$;$15q^+$)	大白猪	Popescu 等,1983
t rcp($7p^+$;$13q^-$)	汉普夏	Gustavsson 等,1985
t rcp($9p^+$;$11q^-$)	瑞典约克夏	Gustavsson 等,1982
t rcp($11p^+$;$15q^-$)	瑞典长白猪	Hageltorn 等,1973
t rcp($13p^-$;$14q^+$)	瑞典约克夏	Hageltorn 等,1976
t rcp($15p^+$;$16q^-$)	瑞典约克夏	Gustavsson 等,1985

易位中的罗伯逊易位在牛、羊、猪中有广泛报道，尤其在牛中的 1/29 罗伯逊易位最为常见。除此之外，尚存在其他多种罗伯逊易位（表 6-5），而且出现频率也很高。研究表明，在牛中除 1/29 罗伯逊易位能降低繁殖力外，其他的罗伯逊易位尚未发现对个体的显著影响。

表 6-5 染色体的罗伯逊易位

易位染色体	品　种	资料来源
1/4	捷克斯洛伐克牛	Lojda 等，1976
1/23	捷克斯洛伐克牛	Lojda 等，1976
1/25	西门塔尔牛	Stranzinger 等，1976
1/27	荷斯坦-弗里兹牛	Miyake 等，1991
1/28	捷克斯洛伐克牛	Lojda 等，1976
1/29	38 个不同品种	许多作者，1964～1978
3/4	利木赞牛	Popescu，1977
3/27	弗里兹牛	Samarineanu 等，1976
4/21		Pinheiro 等，1995
5/18	西门塔尔牛	Papp 等，1980
5/21	日本黑牛	Masuda 等，1978
5/23	罗马尼亚牛	Samarineanu 等，1976
6/16	德克斯特牛	Eldridge，1974
6/28	捷克斯洛伐克牛	Lojda 等，1976
7/21	日本黑牛	Hanada 等，1981
8/2	英国弗里兹牛	Pollock，1974
8/9	瑞士牛	Tschudi 等，1977
10/15	Petargueiras 牛	Pinheiro 等，1980
11/16	匈牙利西门塔尔牛	Kovacs 等，1977
11～12/15～16	Blonda Aguitaine 牛×西门塔尔牛	Bruere 等，1973
11/21	罗马尼亚褐牛	Samarineanu 等，1976
11/22	捷克斯洛伐克牛	Lojda 等，1976
13/21	荷斯坦-弗里兹牛	Kovacs 等，1977
14/20	瑞士西门塔尔牛	Harvey 等，1975
14/24	Podolian 牛	Diberardino 等，1979
4/28	荷兰牛	Ellsworth 等，1979
21/27	Blonde Aguitaine 牛	Berland 等，1988
23/X	奶牛	Gallagher 等，1992
25/27	阿尔卑斯灰牛	Degiovanni 等，1979
27/29	更赛牛	Bongo 等，1976

家畜中，特别是猪、牛、绵羊染色体核仁组织区（nucleolar organizer，NOR）呈现多态性，在这方面有很多相关报道。据报道，牛的 NOR 主要分布在 2 号、3 号、4 号、11 号、28 号和 5 号、8 号、21 号、23 号、26 号以及 X 染色体次缢痕部位，认为是显性遗传。研究表明，在品种间、不同对同源染色体间以及一对同源染色体间其 NOR 都显现多态性。另据报道，猪的 NOR 位于 8 号、

10号染色体次缢痕部位，其数目在1～4之间，呈等显性遗传；据观察，10号染色体的NOR比8号染色体的NOR大而深染，若8号染色体有两个NOR，则往往表现一大一小。其次，不同品种其NOR的均数与众数不同，有随地理位置不同而呈规律性变化的趋势。

此外，在猪和鸡的染色体中还广泛存在C带多态性。据报道，在家猪中主要表现在13～18号端着丝粒染色体，其C带大小在品种间、个体间、细胞间、不同对同源染色体间以及一对同源染色体间有所不同，由于着丝粒结构差异染色质分布不均，从而导致C带大小的明显差异。据报道C带多态性的这种品种和个体特征可能与其繁殖性能有关。

Y染色体多态性在畜禽中也有很多报道。据国内报道，通过带型分析发现，国内一些地方猪种，如小香猪、滇南小耳猪、八届猪等其Y染色体长臂有1～2条带纹；而民猪、内江猪、荣昌猪等无带纹。国外猪种，如瑞典长白猪、拉康猪、杜洛克猪，其Y染色体无带纹；而丹麦长白猪、巴克夏猪等则有带纹的多态现象。

牛Y染色体在长度上和着丝粒位置上也有明显的多态现象。据报道，黄牛型牛的Y染色体是亚中央着丝粒，而瘤牛型牛的Y染色体是近端部着丝粒类似于最小常染色体。我国一些地方牛种的Y染色体也呈多态现象，如蒙古牛、晋南牛、丽江黄牛、海南黄牛等为中央或亚中央着丝粒，南阳牛、鲁西牛、峨边花牛等为亚端部或近端部着丝粒，而秦川牛既有中央或亚中央着丝粒又有亚端部或近端部着丝粒的多态现象。

羊和马Y染色体多态性主要表现在长度上的品种间差异。禽类W染色体在物种间大小变化也很大，其幅度可从一个物种其Z染色体大小的1/3到另一物种Z染色体大小的1/8。所以，W染色体在一些物种中容易识别，而在另一些物种中则要用显C带识别，否则从众多较大的小染色体中将其辨认出来是困难的。

第三节　常用中药鉴定举例

一、果实及种子类中药的鉴别

1. 栀子

【来源】 本品为茜草科植物栀子（*Gardenia jasminoides* Ellis）的干燥成熟果实。

【核型分析】

（1）材料　栀子、水栀子（*G. jasminoides* Ellis var. *grandiflora* Nakaihe）的种子。

（2）方法

① 取种子，洗净，用2%双氧水浸15min，于发芽皿中在28℃恒温箱中萌发，带根尖伸展至0.5～1cm，截取根尖。

用改良F-BSG技术制备染色体标本，即上午（8∶30）分截取根尖，置于0.002mol/L羟基喹啉中处理1.5h，再放入2.5%纤维素酶和2.5%果胶酶混合酶液中酶解1h，取出根尖，以蒸馏水低渗10min，以甲醇-冰醋酸（3∶1）固定3h，冲洗，晾干，镜检。

② 核型分析　按李懋学标准，染色体计算和命名按Levan和郭幸荣等方法，核型按Stebbins和Arano标准分类。

（3）结果　见表6-6、表6-7、图6-8、图6-9。

表6-6　山栀子与水栀子染色体核型比较

样品来源	染色体数目	相对长度变化范围/%	染色体长度比	不对称系数AS·K%	NF值	核型类别	染色体相对长度组成	核型公式
A	22	4.62～15.59	3.33	63.1	42	2B	$2n=22=6L+4M_2+6M_1+6S$	$2n=22=12m+6sm+2st+2m(sat)$
B	22	4.93～15.40	3.12	63.5	42	2B	$2n=22=6L+6M_2+M_1+4S$	$2n=22=12m+6sm+2st+2sm(sat)$
C	22	3.82～13.40	3.60	64.1	42	2B	$2n=22=8L+4M_2+2M_1+8S$	$2n=22=12m+6sm+2st+2sm(sat)$

注：样品来源中，A—湖北恩施栀子；B—湖北恩施水栀子；C—广西永福水栀子。

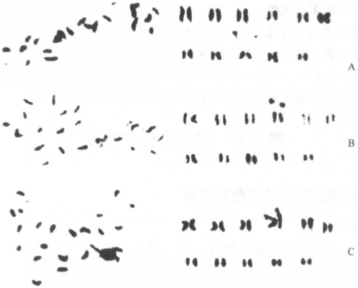


图6-8　栀子的染色体及核型图

A—湖北恩施栀子；B—湖北恩施水栀子；C—广西永福水栀子

表 6-7　栀子的核型分析

样品来源	染色体编号	相对长度/%			相对长度系数 IRL	染色体类别	臂比	着丝点位置
		短臂	长臂	全长				
A	1	6.16	9.23	15.39	1.69	L	1.50	m
B	2	6.16	9.24	13.40	1.69	L	1.50	m
C	3	6.11	7.63	13.73	1.51	L	1.25	m
A	1	3.07	10.78	13.85	1.52	L	3.50	st
B	2	3.08	10.02	13.10	1.44	L	3.25	st
C	3	3.05	9.93	12.98	1.43	L	3.25	st
A	1	3.84	8.46	12.30	1.35	L	2.20	sm
B	2	3.85	6.94	10.79	1.19	M_2	1.80	sm
C	3	3.82	8.93	12.21	1.34	L	2.20	sm
A	1	3.08	6.92	10.00	1.10	M_2	2.25	sm
B	2	3.08	6.94	10.02	1.10	M_2	2.25	sm①
C	3	3.05	8.40	11.45	1.26	L	2.70	sm①
A	1	3.85	5.39	9.24	1.02	M_2	1.75	sm
B	2	2.31	6.94	9.25	1.02	M_2	3.00	sm
C	3	3.82	6.87	10.69	1.18	M_2	2.25	sm
A	1	3.85	4.61	8.46	0.93	M_1	1.20	m
B	2	3.85	4.63	8.48	0.93	M_1	1.20	m
C	3	3.82	4.10	9.92	1.11	M_2	1.60	m
A	1	3.08	3.61	7.69	0.85	M_1	1.50	m
B	2	2.31	5.39	7.70	0.85	M_1	2.33	m
C	3	2.29	5.34	7.73	0.84	M_1	2.33	m
A	1	3.08	3.84	6.92	0.76	M_1	1.25	m
B	2	3.08	3.85	6.93	0.76	M_1	1.25	m
C	3	3.05	3.81	6.86	0.75	S	1.25	m
A	1	2.31	3.84	6.15	0.68	S	1.67	m①
B	2	3.08	3.85	6.93	0.76	M_1	1.25	m
C	3	2.29	3.82	6.11	0.67	S	1.67	m
A	1	2.31	3.07	5.38	0.59	S	1.33	m
B	2	3.39	3.39	6.47	0.71	S	1.10	m
C	3	2.29	2.29	4.58	0.50	S	1.00	m
A	1	2.31	2.31	4.62	0.51	S	1.00	m
B	2	1.85	3.08	4.93	0.54	S	1.67	m
C	3	1.53	2.29	3.82	0.42	S	1.50	m

① 随体染色体。

注：A—湖北恩施栀子；B—湖北恩施水栀子；C—广西永福水栀子。

【附】 栀子和水栀子的染色体数目均为 $2n=22$。染色体较小，在晚前期与中期分裂相中，最长染色体为 4μm，最短的仅 1μm。

3 个样品的染色体相对长度变化为 3.82%～15.40%，但染色体的类别、长短，染色体的构成不同。着丝点位置以中部（m）和近中部（sm）为主，栀子有 7 对中间着丝点染色体，而水栀子有 6 对。三者都有 1 对随体，栀子的随体位于第 9 对染色体上，为中部着丝点；两个水栀子的随体位于第 4 对染色体上，为近中部着丝点。

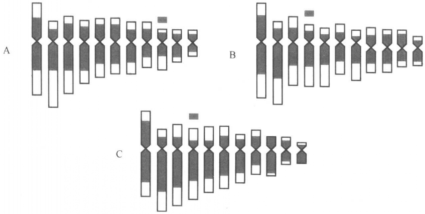


图 6-9 栀子染色体核型带型模式

A—湖北恩施栀子；B—湖北恩施水栀子；C—广西永福水栀子

染色体长度比为 3.12～3.60，NF 值（臂指数）均为 42，臂比值大于 2 的染色体比例为 0.27～0.45，属于 2B 核型，染色体核型不对称系数（AS·K%）为 63.1%～64.1%，核型较为对称。Giemsa 带型以 C/C 为主。

2. 枸杞子

【来源】 本品为茄科植物宁夏枸杞（*Lycium barbarum* L.）的干燥成熟果实。

【核型分析】

（1）材料　野生枸杞及大叶枸杞的嫩芽。

（2）方法

① 嫩芽切下后置于饱和对二氯苯水溶液与 α-溴萘各半的混合液中，处理 3h，将材料转入 0.075mol/L 氯化钾溶液中低渗 45min，然后置新鲜固定液甲醇-冰醋酸（3∶1）中固定 25min；切取其顶端分生组织部分置载玻片中央的固定液中，用镊子夹碎使之分散后，在火焰上干燥，用 Giemsa（1∶20，pH6.8）染色 25min，流水冲洗，晾干，观察，进行核型分析。

② 核型分析　染色体计算按 Levan 方法，核型分类按 Stebbins 标准。

（3）结果　见表 6-8、表 6-9、图 6-10、图 6-11、图 6-12、图 6-13。

表 6-8　野生枸杞染色体相对长度、臂比及着丝点位置

染色体序号	相对长度/%			臂比	着丝点位置	染色体序号	相对长度/%			臂比	着丝点位置
	长臂	短臂	全长				长臂	短臂	全长		
1	7.02	5.19	12.21	1.35	m	7	4.57	3.50	8.07	1.31	m
2	5.91	3.98	9.98	1.48	m	8	4.96	2.71	7.67	1.83	sm
3	5.55	3.92	9.47	1.42	m	9	3.88	3.60	7.48	1.08	m
4	5.73	3.10	8.83	1.85	sm	10	4.07	3.08	7.15	1.32	m
5	4.32	4.01	8.42	1.08	m	11	3.79	2.58	6.37	1.47	m
6	5.51	2.87	8.38	1.92	sm	12	3.27	2.67	5.95	1.22	m

表 6-9　大叶枸杞染色体相对长度、臂比及着丝点位置

染色体序号	相对长度/%			臂比	着丝点位置	染色体序号	相对长度/%			臂比	着丝点位置
	长臂	短臂	全长				长臂	短臂	全长		
1	6.89	5.14	12.03	1.34	m	7	4.51	3.35	7.86	1.35	m
2	6.21	4.06	10.27	1.53	m	8	5.04	2.79	7.83	1.81	sm
3	5.26	3.99	9.25	1.32	m	9	3.98	3.63	7.61	1.10	m
4	5.93	3.05	8.98	1.94	sm	10	3.96	3.00	6.96	1.32	m
5	4.51	4.08	8.59	1.11	m	11	3.89	2.69	6.58	1.45	m
6	5.66	2.61	8.27	2.17	sm	12	3.16	2.48	5.64	1.27	m



(a) 染色体　　(b) 核型

图 6-10　野生枸杞染色体形态及核型



(a) 染色体　　(b) 核型

图 6-11　大叶枸杞染色体形态及核型

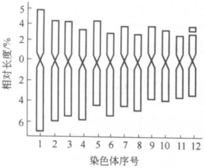


图 6-12　野生枸杞染色体核型模式图

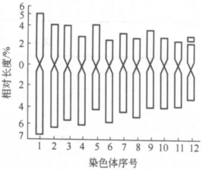


图 6-13　大叶枸杞染色体核型模式图

【附】 野生枸杞：染色体数目是 24，为二倍体，实际长度变化范围 6.87～3.35μm，第 12 号染色体具随体，核型为 1B 型，核型公式为 $2n=24=18m+6sm$。大叶枸杞：染色体数目为 48，是四倍体，实际长度变化范围是 6.71～3.17μm，第 12 号染色体具随体，核型为 2B 型，核型公式为 $2n=4x=48=36m+12sm$。

3. 五味子

【来源】 本品为木兰科植物五味子［*Schisandra chinensis*（Turcz.）Baill.］或华中五味子（*Schisandra sphenanthera* Rehd. et Wils.）的干燥成熟果实。

【核型分析】

（1）材料　五味子、红花五味子、翅枝五味子、华中五味子、柔毛五味子和毛脉五味子。

（2）方法　取长约 1cm 以下的嫩叶，用 0.1%秋水仙素处理 1h，再用卡诺（Carnoy）固定液固定 24h，转入 70%乙醇保存。染色时先用 1mol/L HCl 在 60℃恒温下解离 10min，经水冲洗后在改良醋酸洋红染色液中染色片刻，压片，镜检。

取染色体分散良好的中期分裂标本照相，进行同源染色体配对，测量其长度、臂比和着丝点位置等。染色体的分类根据 Levan 等的标准，核型的不对称性按 Stebbins 的分类标准，不对称系数的计算采用 Arano 的方法，即 AS·K%＝长臂总长度/全组染色体总长度。

（3）结果　见表 6-10～表 6-14、图 6-14、图 6-15。

表 6-10　翅枝五味子核型分析

绝对长度/μm			相对长度/%	臂比	着丝点位置	绝对长度/μm			相对长度/%	臂比	着丝点位置
长臂	短臂	全长				长臂	短臂	全长			
2.67	2.34	5.01	10.55	1.15	m	1.68	1.51	3.19	6.72	1.11	m
2.33	2.11	4.44	9.35	1.10	m	1.61	1.57	3.18	6.70	1.03	m
2.51	1.50	4.01	8.44	1.67	m	1.96	1.03	2.99	6.30	1.90	sm
2.01	1.83	3.84	8.09	1.09	m	1.52	1.27	2.79	5.88	1.20	m
1.84	1.67	3.51	7.39	1.10	m	1.88	0.89	2.77	5.84	2.11	sm
1.74	1.71	3.44	7.25	1.01	m	1.37	1.30	2.67	5.62	1.05	m
1.67	1.63	3.30	6.95	1.02	m	1.32	1.01	2.33	4.91	1.30	m

表 6-11　红花五味子核型分析

绝对长度/μm			相对长度/%	臂比	着丝点位置	绝对长度/μm			相对长度/%	臂比	着丝点位置
长臂	短臂	全长				长臂	短臂	全长			
3.96	2.79	6.75	9.92	1.42	m	2.87	1.69	4.56	6.70	1.70	sm
3.51	2.78	6.29	9.24	1.26	m	2.32	2.32	4.55	6.69	1.04	m
2.79	2.72	5.51	8.10	1.03	m	2.29	2.22	4.51	6.63	1.03	m
3.54	1.80	5.34	7.85	1.97	sm	2.22	1.94	4.16	6.11	1.14	m
3.11	2.12	5.23	7.69	1.47	m	2.23	1.78	4.01	5.89	1.25	m
2.78	2.17	4.95	7.27	1.28	m	2.18	1.67	3.85	5.66	1.31	m
3.21	1.71	4.92	7.23	1.88	sm	1.83	1.67	3.50	5.14	1.10	m

表 6-12　华中五味子核型分析

绝对长度/μm			相对长度/%	臂比	着丝点位置	绝对长度/μm			相对长度/%	臂比	着丝点位置
长臂	短臂	全长				长臂	短臂	全长			
3.44	3.00	6.44	9.28	1.15	m	2.80	2.06	4.86	7.01	1.36	m
3.50	2.56	6.06	8.74	1.37	m	2.50	2.19	4.69	6.76	1.14	m
3.31	2.50	5.81	8.38	1.32	m	2.49	2.00	4.49	6.47	1.25	m
3.13	2.51	5.64	8.13	1.25	m	2.51	1.87	4.38	6.31	1.34	m
2.81	2.53	5.34	7.70	1.11	m	2.25	1.94	4.19	6.04	1.16	m
3.44	1.88	5.32	7.67	1.83	sm	2.12	1.88	4.00	5.77	1.13	m
3.14	1.89	5.03	7.25	1.66	m	1.86	1.25	3.11	4.48	1.49	m

表 6-13　柔毛五味子核型分析

绝对长度/μm			相对长度/%	臂比	着丝点位置	绝对长度/μm			相对长度/%	臂比	着丝点位置
长臂	短臂	全长				长臂	短臂	全长			
2.05	1.72	3.77	9.30	1.19	m	1.52	1.37	2.83	6.98	1.16	m
2.05	1.56	3.66	8.90	1.31	m	1.53	1.23	2.76	6.81	1.24	m
2.01	1.44	3.45	8.51	1.40	m	1.64	1.03	2.67	6.58	1.59	m
1.72	1.64	3.36	8.29	1.05	m	1.63	0.81	2.45	6.04	2.01	sm
2.01	1.19	3.20	7.89	1.70	sm	1.23	1.03	2.26	5.57	1.19	m
1.76	1.27	3.03	7.47	1.39	m	1.13	0.81	2.12	5.23	1.62	m
1.60	1.40	3.00	4.40	1.14	m	1.20	0.84	2.04	5.03	1.43	m

表 6-14　毛脉五味子核型分析

绝对长度/μm			相对长度/%	臂比	着丝点位置	绝对长度/μm			相对长度/%	臂比	着丝点位置
长臂	短臂	全长				长臂	短臂	全长			
4.70	1.89	6.59	9.38	2.49	sm	2.61	2.28	4.89	6.96	1.14	m
3.59	2.55	6.14	8.74	1.41	m	2.62	2.09	4.71	6.71	1.25	m
3.53	2.35	5.88	8.37	1.50	m	2.60	1.89	4.49	6.39	1.38	m
3.17	2.45	5.62	8.00	1.29	m	3.07	1.30	4.37	6.22	2.36	sm
2.94	2.48	5.42	7.72	1.19	m	2.29	1.95	4.24	6.04	1.17	m
3.00	2.29	5.29	7.53	1.31	m	2.08	1.83	3.91	5.57	1.14	m
3.07	2.15	5.22	7.43	1.43	m	2.10	1.37	3.47	4.94	1.53	m

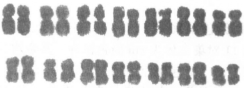


图 6-14　华中五味子的核型图

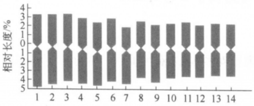


图 6-15　华中五味子的核型模式图

【附】

① 翅枝五味子的染色体数目为 $2n=28$。核型公式：$K(2n)=28=24m+4sm$。除第 10 对及第 12 对染色体为 sm 染色体外，其余均为 m 染色体。全组染色体总长度为 47.47μm，染色体全长在 2.33～5.01μm 之间，相对长度在 4.91%～10.55%之间；最长染色体为最短染色体的 2.15 倍，臂比变异范围在 1.01～2.11 之间。臂比大于 2 的比例为 0.07，属 2B 型，核型不对称系数为 57.12%，几乎对称。

② 红花五味子的染色体数目为 $2n=28$。核型公式：$K(2n)=28=22m+6sm$。除第 4 对、第 7 对、第 8 对染色体为 sm 染色体，其余为 m 染色体。全组染色体总长度为 68.05μm，染色全长在 3.50～6.75μm 之间，相对长度在 5.14%～9.92%之间；最长染色体为最短染色体的 1.93 倍，臂比变异范围在 1.03～1.97 之间。臂比大于 2 的比例为 0.00，属 1A 型，核型不对称系数为 54.53%，几乎对称。

③ 华中五味子的染色体数目为 $2n=28$。核型公式：$K(2n)=28=26m+2sm$。除第 6 对染色体为 sm 染色体外，其余均为 m 染色体。全组染色体总长度为 69.36μm，染色体全长在 3.11～6.44μm 之间，相对长度在4.48%～9.28%之间；最长染色体为最短染色体的 2.07，臂比变异范围在 1.11～1.83 之间。臂比大于 2 的比例为 0.00，属 1B 型，核型不对称系数为 56.66%，几乎对称。

④ 柔毛五味子的染色体数目为 $2n=28$。核型公式：$K(2n)=28=24m+4sm$。除第 5 对、第 11 对染色体为 sm 染色体，其余均为 m 染色体。全组染色体总长度为 40.55μm，染色体全长在 2.04～3.77μm 之间，相对长度在5.03%～9.30%之间；最长染色体为最短染色体的 1.85 倍，臂比变异范围在 1.05～2.01 之间。臂比大于 2 的比例为 0.07，属 2A 型，核型不对称系数为 57.36%，几乎对称。

⑤ 毛脉五味子的染色体数目为 $2n=28$。核型公式：$K(2n)=28=24m+4sm$。除第 1 对、第 11 对染色体为 sm 染色体外，其余均为 m 染色体。全组染色体总长度为 70.24μm，染色体全长在 3.47～6.59μm 之间，相对长度在 4.94%～9.38%之间；最长染色体为最短染色体的 1.90 倍，臂比变异范围在 1.14～2.49 之间。臂比大于 2 的比例为 0.14，属 2A 型，核型不对称系数为 58.9%，几乎对称。

4. 菟丝子

【来源】 本品为旋花科植物菟丝子（*Cuscuta chinensis* Lam.）的干燥成熟种子。

【核型分析】

（1）材料　菟丝子、大菟丝子（*C. japonica* Choisy.）的种子。

（2）方法

① 取样品用浓硫酸浸泡，菟丝子 60min、大菟丝子 40min，清水漂洗，然后在 25℃的恒温箱内培养，待根长到 0.5～1.0cm 时，切下根尖，用 0.1005%秋水仙碱溶液预处理 2～3h，水洗后转入蒸馏水低渗处理 2～3h（置于冰箱内）。用 2.15%混合酶液，于 37℃下酶解 10～12h，蒸馏水轻轻冲洗数次，吸干水后，加入甲醇-冰醋酸（3∶1）固定液固定 0.15h，用蒸汽干燥法制片。

② 染色体观察　取标本片，在高倍镜及油镜下观察，计数分散良好、无明显缺失的中期分裂相，确定其染色体数目（$2n$）；并选择染色体数目完整，无重叠的分裂相进行显微拍照，分别测量和计算各对染色体的绝对长度、相对长度、臂比和着丝点位置。根据 Levan 等提出的染色体分类标准，进行染色体的分类和归组。同时，挑选一个比较具有代表性的分裂相排成核型，m 组染色体排在最前面，t 组在后，各组均按大小顺序排列。

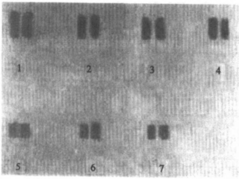
③ 染色体的相对长度系数（IRL＝染色体长度/全组染色体平均长度）按郭幸荣等的方法，即 IRL≥1.26 为长染色体（L）；1.01≤IRL≤1.25 为中长染色体（M_2）；0.76≤IRL≤1.00 为中短染色体（M_1）；IRL＜0.76 为短色染色体（S）。

④ 核型不对称系数（AS·K%＝长臂总长度/全组染色体总长度）按 Arano 的方法计算。

⑤ 染色体核型的不对称性类型按 Stebbins 的方法来划分，1A 为最对称，4C 最不对称。

（3）结果　见图 6-16、图 6-17、表 6-15、表 6-16。

【附】 菟丝子的体细胞染色体数为 $2n=14$，但在菟丝子同一种不同根尖材料中，存在着 $2n=35$ 的倍性变异，根据其染色体基数 $x=7$ 计算，表明在菟丝子种内不同个体中存在着五倍体。未发现非整倍性变异和 B 染色体。



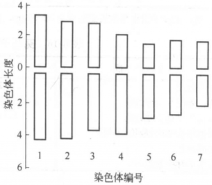


图 6-16 .菟丝子的染色体及核型模式

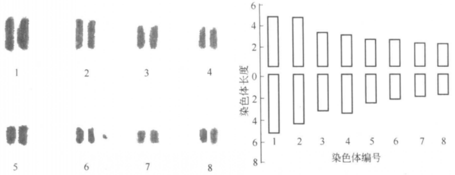


图 6-17　大菟丝子的染色体及核型模式

表 6-15　菟丝子与大菟丝子的染色体长度、臂比和类型

分类群	编号	绝对长度/μm			相对长度/%	相对长度系数/(IRL)	臂比(长/短)	着丝点位置
		短臂	长臂	全长				
Ⅰ菟丝子	1	3.32	4.30	7.62	19.49	1.37(L)	1.30	m
	2	2.98	4.23	7.21	18.44	1.29(L)	1.42	m
	3	2.95	3.56	6.51	16.65	1.17(M_2)	1.21	m
	4	2.26	3.80	6.06	15.50	1.09(M_2)	1.68	m
	5	1.66	2.73	4.39	11.23	0.79(M_1)	1.64	m
	6	1.90	2.40	4.30	11.00	0.77(M_1)	1.26	m
	7	1.21	1.79	3.00	7.67	0.54(S)	1.48	m
Ⅱ大菟丝子	1	4.72	5.28	10.00	19.86	1.59(L)	1.12	m
	2	4.48	4.50	8.98	17.84	1.43(L)	1.00	m
	3	3.27	3.30	6.57	13.05	1.04(M_2)	1.01	m
	4	2.85	3.65	6.50	12.91	1.03(M_2)	1.28	m
	5	2.34	2.77	5.11	10.15	0.81(M_1)	1.18	m
	6	2.36	2.49	4.85	9.63	0.77(M_1)	1.06	m
	7	1.99	2.25	4.24	8.42	0.67(S)	1.13	m
	8	1.89	2.21	4.10	8.14	0.65(S)	1.17	m

注：菟丝子的染色体组总长度为 39.09μm，大菟丝子染色体组总长度为 50.35μm。

表 6-16　菟丝子与大菟丝子核型的比较

分　类　群	菟　丝　子	大　菟　丝　子
核型公式	K(2n)=14=14m	K(2n)=16=16m
染色体相对长度组成	2n=14=2L+2M_2+2M_1+1S	2n=16=2L+2M_2+2M_1+2S
染色体相对长度差值	11.82(7.67～19.49)	11.72(8.14～19.86)
染色体长度比(最长/最短)	2.54	2.44
核型类型	1A	1A
核型不对称系数/%	58.35	52.53

大菟丝子体细胞染色体数为 2n=16，观察中还发现在大菟丝子的同一种不同根尖材料中，还分别存在着 2n=24，32，40，56 的倍性变异，根据其染色体

基数 $x=8$ 计算，表明在大菟丝子种内的不同个体中也分别存在着三倍体、四倍体、五倍体、七倍体等多倍性系列。没有发现非整倍体变异，也未见有 B 染色体。大菟丝子的核型公式为 $K(2n)=16=16m$，按相对长度系数（IRL）值，大菟丝子染色体的相对长度组成可表示为 $2n=16=2L+2M_2+2M_1+2S$。染色体组总长度为 50.35μm，染色体长度的变异幅为 4.10～10.00μm，最长染色体与最短染色体之比为 2.44，臂比变异幅度为 1.00～1.28。

菟丝子与大菟丝子的染色体核型均由臂比小于 2 的中部着丝点染色体组成，根据 Stebbins 的“不对称核型”的分类标准，应属于 1A 型。

5. 千金子

【来源】 本品为大戟科植物续随子（*Euphorbia lathyris* L.）干燥成熟种子。

【核型分析】

（1）方法　按常规方法。当胚根长至 0.5～1.0cm 时，切取胚根，用 0.1% 秋水仙碱在室温下预处理 3.5h，用 50% 乙醇清洗后，放入卡诺固定液固定 24h，再将材料转入预热 60℃的 1mol/L 盐酸中解离 8min，用改良的石炭酸品红液染色，蒸馏水清洗后再用果胶酶液于 37℃恒温下酶解，压片。冰冻法制片，二甲苯透明，中型树脂胶封片。观察计数，作核型分析。

（2）结果　见图 6-18，图 6-19，表 6-17，表 6-18。

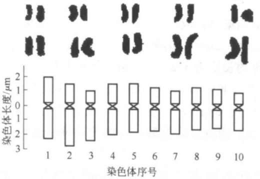


图 6-18　续随子核型图

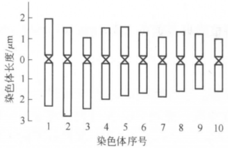


图 6-19　续随子核型模式图

表 6-17　续随子染色体参数

染色体序号	绝对长度/μm			相对长度/%	相对长度系数	臂比	着丝点位置	染色体类别
	长臂	短臂	全长					
1	2.26	1.99	4.25	13.08	1.31	1.14	m	L
2	2.75	1.48	4.23	13.02	1.30	1.86	sm	L
3	2.47	1.02	3.49	10.74	1.07	2.42	sm	M_2
4	1.93	1.53	3.46	10.65	1.06	1.26	m	M_2
5	1.71	1.57	3.28	10.10	1.01	1.09	m	M_2
6	1.65	1.28	2.93	9.02	0.90	1.29	m	M_1
7	1.76	1.09	2.85	8.77	0.88	1.61	m	M_1
8	1.45	1.36	2.81	8.65	0.86	1.07	m	M_1
9	1.38	1.25	2.63	8.09	0.81	1.10	m	M_1
10	1.53	1.03	2.56	7.88	0.79	1.49	m	M_1

注：染色体总长度为 32.49μm。

表 6-18　续随子染色体的体积

染色体序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
染色体宽度/μm	0.92	0.94	0.88	1.02	1.03	0.77	0.72	0.72	0.81	0.76
染色体长度/μm	4.25	4.23	3.49	3.46	3.28	2.93	2.85	2.81	2.63	2.56
染色体体积/μm^3	2.82	2.93	2.12	2.83	2.73	1.36	1.16	1.14	1.35	1.16

注：染色体总体积为 19.60μm^3。

【附】 续随子体细胞染色体数目为 $2n=20$。此外，还观察到 $2n=22$ 的细胞 1 个，$2n=19$ 的细胞 2 个，$2n=18$ 的细胞 1 个，共占计算细胞总数的 8%。

续随子的染色体平均长度为 3.25μm。染色体相对长度组成为 $2n=20=4L+6M_2+10M_1$。核型公式为 $K(2n)=2x=20=16m+4sm$。全组染色体总长度为 32.49μm，长臂总长为 18.89μm，根据 Arano 的方法计算，核型不对称系数（AS·K%）为 58.14%，为较对称类型。根据 Stebbins 的核型分类标准，续随子染色体组为 2A 型。

染色体体积：变化范围在 2.93～1.14μm^3 之间。全组染色体总体积为 19.60μm^3。

6. 沙苑子

【来源】 本品为豆科植物扁茎黄芪（*Astragalus complanatus* R. Br.）的干燥成熟种子。

【核型分析】

（1）方法　按常规方法。当胚根长至 1～1.5cm 时，即截取根尖，用 0.15% 和 0.20% 秋水仙碱分别在室温下处理 4h，经反复清洗干净，用卡诺固定液固定 24h。解离前先用蒸馏水清洗 10min 左右，转入恒温 60℃ 的 1mol/L 盐酸中解离，然后取 1～2mm 根尖，用 1.5% 纤维素酶-1.5% 果胶酶（1∶1）在室温下解离

2～3 (4)h。酶解后洗净残留的酶液，加石炭酸品红染色液染色 24～36h。用 45%的冰醋酸分色 2～3min，除去醋酸。制片时染色体分散，然后在镜下观察。选择染色体分散、核相较好的、符合分析要求的制片，用冰冻法封片，并作显微摄影及核型分析。

(2) 结果　见图 6-20、图 6-21、图 6-22、表 6-19。



图 6-20　沙苑子体细胞分裂中期 ($2n=16$)

【附】 沙苑子体细胞染色体数目为 $2n=16$。其染色体平均长度为 4.13μm，染色体相对长度组成为 $2n=16=6M_2+10M_1$。染色体总长为 33.05μm，长臂总长为 19.76μm，根据 Arano 的计算方法，核型不对称系数 (AS·K%) 为 59.79%，对称程度较高。8 对染色体的长度变化在 3.61～



图 6-21　沙苑子染色体核型图

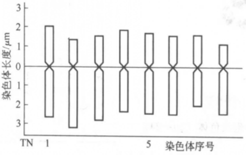


图 6-22　沙苑子染色体核型模式图

表 6-19　沙苑子染色体参数

染色体编号	绝对长度/μm			相对长度/%	相对长度系数	臂比 (L/S)	着丝点位置	染色体类别
	长臂	短臂	全长					
1	2.62	2.09	4.71	14.25	1.14	1.25	m	M_2
2	3.11	1.42	4.53	13.71	1.10	2.19	sm	M_2
3	2.76	1.59	4.35	13.16	1.05	1.74	sm	M_2
4	2.22	1.89	4.11	12.44	1.00	1.17	m	M_1
5	2.33	1.76	4.09	12.38	0.99	1.32	m	M_1
6	2.39	1.62	4.01	12.13	0.97	1.48	m	M_1
7	1.95	1.69	3.64	11.01	0.88	1.15	m	M_1
8	2.38	1.23	3.61	10.92	0.87	1.93	sm	M_1

4.71μm 之间，最长染色体与最短染色体之比为 1.30：1，臂比值变化范围为 1.15～2.19，其中第 2 对染色体臂比值大于 2，占染色体组的 12.5%。沙苑子核型属于 2A 型。染色体体积根据 De-vescovi 等的染色体体积计算公式，体积变化范围在 5.37～7.36μm^3 之间，染色体组总体积为 50.62μm^3。

7. 白刺

【来源】 本品为蒺藜科植物白刺（*Nitraria sibirica* Pall.）的果实。

【核型分析】

（1）方法

① 种子在常温下浸泡 24h，于 25～28℃温箱内培养萌发，待根尖长至 1cm 左右时，切下用对二氯苯饱和水溶液处理 2.5～3h，卡诺固定液（纯酒精 3：冰醋酸 1）固定 3～24h，水洗后用 1mol/L HCl 在 60℃温箱中解离 8min，苏木精染液整染 1h，常规压片，冰冻揭片，中性树脂胶封片后显微照相。

② 核型分析 按李懋学、陈瑞阳报道的标准，核型分类以 stebbins 的方法。

（2）结果 见图 6-23，图 6-24，图 6-25，表 6-20。



图 6-23 白刺体细胞染色体（2n=24）

表 6-20 白刺染色体核型分析

染色体编号	相对长度/%			臂比（长/短）	着丝点位置
	长臂	短臂	全长		
1	6.45	3.49	9.94	1.85	sm
2	5.93	3.78	9.71	1.57	m
3	5.23	3.72	8.95	1.41	m
4	4.65	4.07	8.72	1.14	m
5	4.48	4.07	8.55	1.10	m
6	5.29	3.20	8.49	1.65	m
7	4.59	3.78	8.37	1.21	m
8	4.71	3.55	8.26	1.33	m
9	4.07	3.43	7.50	1.19	m
10	4.24	3.26	7.50	1.30	m
11	4.24	3.14	7.38	1.35	m
12	3.78	2.85	6.63	1.33	m



图 6-24 白刺染色体核型

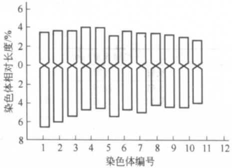


图 6-25 白刺染色体核型模式图

【附】 白刺染色体数目为 $2n=24$。其核型公式为 $K(2n)=24=22m+2sm$。白刺体细胞的 12 对染色体中，除第 1 对染色体为近中部着丝点染色体（sm）外，其余 11 对均为中部着丝点染色体（m），未发现随体、缺体和多倍体现象。染色体总长度为 100.00μm，相对长度的变化范围为 6.63%～9.94%，臂比幅度为 1.10～1.85。白刺最长染色体与最短染色体之比为 1.50，小于 2；臂比值大于 2 的染色体为 0.00，属 1A 型。

8. 酸枣仁

【来源】 本品为鼠李科植物酸枣（*Ziziphus jujuba* Mill. var. *spinosa*（Bunge.）Hu ex H. F.）的干燥成熟种子。

【核型分析】

（1）材料　赞里酸枣 15 号（SS15）、小绿豆酸枣，于 5 月中下旬取其分裂盛期的茎尖和幼叶。

（2）方法　在室温下用 0.02%秋水仙碱处理茎尖或幼叶，用去壁低渗法制备染色体标本。核型分析：染色体计数统计 30 个细胞，核型分析取 5 个细胞的平均值。核型类别采用 Stebbins（1971）分类标准，分析中的计算和染色体命名按 Levan 的方法。

（3）结果　见图 6-26、图 6-27、表 6-21。

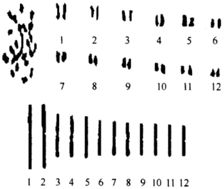


图 6-26　赞皇酸枣的染色体核型

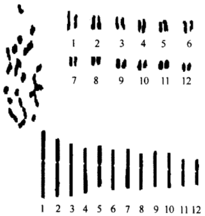


图 6-27　小绿豆酸枣的染色体核型

【附】 SS15〔赞星酸枣 15 号〕核型公式：$2n=2x=24=6M+18m$。染色体全长范围为 6.24～13.42μm，相对长度变化范围为 6.24%～13.42%，最长与最短染色体之比为 2.15，不对称系数 AS·K 为 52.65%，平均臂比是 1.10，染色体总长度为 100.00μm，核型为 1B 型。

小绿豆酸枣核型公式：$2n=2x=24=22m+2sm$。染色体全长变化范围为 5.10～13.45μm，相对长度变化范围为 5.10%～13.45%，最长与最短染色体之

比为 2.64，不对称系数为 57.01%，平均臂比为 1.33，染色体总长度为 100.00μm，核型为 1B 核型。

表 6-21　酸枣不同类型的染色体相对长度、臂比和类型

酸枣类型	序号	相对长度/%			臂比（长/短）	着丝点位置	酸枣类型	序号	相对长度/%			臂比（长/短）	着丝点位置
		长臂	短臂	全长					长臂	短臂	全长		
SS15 即赞皇酸枣 15 号	1	7.70	5.72	13.42	1.35	m	小绿豆酸枣	1	7.29	6.16	13.45	1.18	m
	2	6.97	6.04	13.01	1.15	m		2	6.73	4.78	11.51	1.41	m
	3	4.47	4.37	8.84	1.02	m		3	6.56	4.05	10.61	1.62	m
	4	4.47	4.27	8.74	1.05	m		4	5.83	3.32	9.15	1.76	sm
	5	4.27	4.16	8.43	1.03	m		5	4.29	4.05	8.34	1.06	m
	6	4.89	3.33	8.22	1.47	m		6	4.94	3.16	8.10	1.56	m
	7	3.54	3.54	7.08	1.00	M		7	4.29	3.40	7.69	1.26	m
	8	3.54	3.33	6.87	1.06	m		8	4.29	2.67	6.96	1.61	m
	9	3.33	3.23	6.56	1.03	m		9	3.48	3.40	6.88	1.02	m
	10	3.23	3.12	6.35	1.03	m		10	3.72	3.16	6.88	1.18	m
	11	3.12	3.12	6.24	1.00	M		11	2.92	2.35	5.27	1.24	m
	12	3.12	3.12	6.24	1.00	M		12	2.67	2.43	5.10	1.10	m

9. 月见草子

【来源】 本品为柳叶菜科植物红萼月见草（*Oenothera erythrosepala* Borb.）的干燥成熟种子。

【核型分析】

（1）方法　将种子在常温下浸泡 24h，于 25～28℃温箱中培养。当根尖长到 0.5～1cm 时，切下投入 0.002mol/L 的 8-羟基喹啉溶液中处理 3～4h，然后转入卡诺固定液中固定 3～24h，水洗后用 1mol/L 的 HCl 在 60℃温箱中解离 8～10min，石炭酸品红染色 30min，常规压片。冰冻切片，中性树脂胶封片。核型分类以 Stebbins 的方法。

（2）结果　见表 6-22、图 6-28。

表 6-22　月见草染色体核型分析

染色体序号	染色体绝对长度/μm			染色体相对长度/%	臂比	着丝点位置	相对长度系数
	长臂	短臂	全长				
1	1.57	1.34	2.91	15.87	1.17	m	1.11(M_2)
2	1.52	1.37	2.89	15.76	1.11	m	1.10(M_2)
3	1.47	1.24	2.71	14.77	1.19	m	1.03(M_2)
4	1.35	1.24	2.59	14.12	1.09	m	0.99(M_1)
5	1.49	1.08	2.57	14.01	1.38	m	0.98(M_1)
6	1.25	1.11	2.36	12.87	1.13	m(sat)	0.90(M_1)
7	1.22	1.09	2.31	12.60	1.20	m	0.88(M_1)

注：染色体总长 18.34μm，随体长度不计其内。

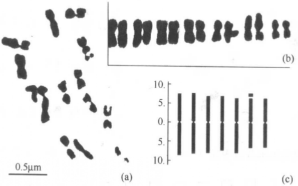


图 6-28 月见草染色体核型图

(a) 月见草的体细胞染色体，示 $2n=14$；(b) 月见草的染色体核型；
(c) 月见草的染色体核型模式图（坐标为相对长度%）

【附】 月见草染色体数目为 $2n=14$。核型公式为 $K(2n)=2x=14=14m$ (2sat)，全为中部着丝点染色体（m），第 6 对染色体短臂上具随体（sat）。

染色体相对长度组成为 $2n=14=6M_2+8M_1$，即由 6 条中长染色体（M_2）、8 条中短染色体（M_1）组成。

染色体总长度为 18.34μm，全长变化范围在 2.31～2.91μm，相对长度变化范围在 12.60%～15.87%，臂比变化范围在 1.09～1.38，平均臂比 1.18，最长染色体与最短染色体长度比 1.26，臂比大于 2 的染色体为 0，核型应为 1A。核型不对称系数为 AS·K%=53.8%。

10. 金挖耳

【来源】 本品为菊科植物金挖耳（Carpesium cermnon.）的全草。

【核型分析】

(1) 方法 按常规方法。取种子放在铺有双层滤纸的培养皿中并于 25℃的恒温箱中培养。当根长至 1.0～1.5cm 时截取根尖，在室温下用 1.5%秋水仙碱液暗处理 2h，清洗，用卡诺固定液固定，经反复冲洗，转入 60℃预热过的 1mol/L 盐酸中解离 9min，清洗后用卡宝品红染色。染色后用混合酶液（2%纤维素酶-2%果胶酶，2∶1）在 37℃恒温下解离 50min。除去酶液，加卡诺氏固定液处理 20min，再将材料用 45%醋酸分色、压片。采用冰冻法制片，37℃恒温干燥，二甲苯透明，中性树脂胶封片。

(2) 结果 见图 6-29、图 6-30、图 6-31、表 6-23、表 6-24。

【附】 金挖耳染色体数 $2n=40$；此外，还观察到 $2n=38$、$2n=39$ 的细胞各 4 个，占计数细胞的 8%。

金挖耳染色体平均长度为 1.39μm。染色体组相对长度组成为 $2n=40=8L+6M_2+16M_1+10S$。核型公式为 $K(2n)=40=24m+12sm+2st+2T$。



图 6-29　金挖耳根尖细胞分裂中期（$2n=40$）

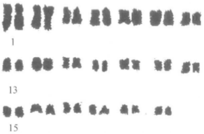


图 6-30　金挖耳核型图



图 6-31　金挖耳核型模式图

表 6-23　金挖耳核型参数

染色体编号	染色体长度/μm			相对长度/%	相对长度系数	臂比	着丝点位置	染色体类别
	短臂	长臂	全长					
1	0.97	1.74	2.71	9.73	1.95	1.79	sm	L
2	0.85	1.73	2.58	9.26	1.85	2.04	sm	L
3	0.70	1.12	1.82	6.53	1.31	1.60	m	L
4	0.81	0.96	1.77	6.35	1.27	1.19	m	L
5	0.78	0.97	1.75	6.28	1.26	1.24	m	M_2
6	0.75	0.93	1.68	6.03	1.21	1.24	m	M_2
7	0.66	0.79	1.45	5.20	1.04	1.20	m	M_2
8	0.32	0.99	1.31	4.70	0.94	3.09	st	M_2
9	0.45	0.83	1.28	4.59	0.92	1.84	sm	M_1
10	0.51	0.75	1.26	4.52	0.90	1.47	m	M_1
11	0.36	0.83	1.19	4.27	0.85	2.31	sm	M_1
12	0.55	0.61	1.16	4.16	0.83	1.11	m	M_1
13	0.51	0.58	1.09	3.91	0.78	1.14	m	M_1
14	0.44	0.64	1.08	3.88	0.78	1.46	m	M_1
15	0	1.06	1.06	3.81	0.76	∞	T	M_2
16	0.31	0.71	1.02	3.66	0.73	2.29	sm	S
17	0.46	0.51	0.97	3.48	0.70	1.11	m	S
18	0.29	0.64	0.93	3.34	0.67	2.21	sm	S
19	0.41	0.47	0.88	3.16	0.63	1.15	m	S
20	0.36	0.51	0.87	3.12	0.62	1.42	m	S

注：染色体总长度为 27.86μm。

表 6-24 金挖耳染色体体积

染色体编号	长度/μm	宽度/μm	体积/μm³	染色体编号	长度/μm	宽度/μm	体积/μm³
1	2.71	0.88	1.65	11	1.19	0.53	0.26
2	2.58	0.83	1.40	12	1.16	0.79	0.57
3	1.82	0.78	0.87	13	1.09	0.61	0.32
4	1.77	0.85	1.00	14	1.08	0.70	0.42
5	1.75	0.88	1.06	15	1.06	0.72	0.43
6	1.68	0.92	1.17	16	1.02	0.78	0.49
7	1.45	0.82	0.77	17	0.97	0.69	0.36
8	1.31	0.76	0.59	18	0.93	0.72	0.38
9	1.28	0.90	0.81	19	0.88	0.71	0.39
10	1.26	0.71	0.50	20	0.87	0.68	0.32

注：染色体组总体积为 13.76μm³。

金挖耳染色体总长度为 27.86μm，长臂总长 17.37μm，核型不对称系数（AS·K%）是 62.35%，对称程度较高。20 对染色体的长度变化范围在 0.87～2.71μm 间，最长染色体与最短染色体长度比为 3.11∶1，臂比值变化范围在 1.11～∞，其中有 6 对染色体臂比值大于 2，为全组染色体的 30%，根据 Stebbins 的核型分类标准，属于 2B 型。染色体体积根据 De-vescovi 的染色体体积计算公式，体积变化范围在 0.26～1.65μm³ 间，染色体组总体积为 13.76μm³。

11. 牛蒡子

【来源】 本品为菊科植物牛蒡（*Arctiurn lappa* L.）的干燥成熟果实。

【核型分析】

（1）方法 将种子在 26℃温箱内培养萌发，当根尖长到 0.5cm 左右时，切下根尖，经过 0.002mol/L 8-羟基喹啉溶液预处理 2～4h，转入卡诺固定液（95%醇-冰醋酸，3∶1）固定 24h，水洗后用 1mol/L 盐酸在 60℃下解离 5min，再用改良石炭酸品红染液染色 30min，压片镜检，冰冻制片，中性树脂胶封片。

（2）结果 见表 6-25、图 6-32、图 6-33、图 6-34。

表 6-25 牛蒡根尖细胞染色体的测量计算值

染色体编号	相对长度/%			臂比（长/短）	相对长度系数	染色体类型	染色体编号	相对长度/%			臂比（长/短）	相对长度系数	染色体类型
	长臂	短臂	全长					长臂	短臂	全长			
1	5.49	4.73	10.22	1.16	1.84(L)	m	10	3.43	1.62	5.05	2.12	0.91(M_1)	sm
2	4.74	4.09	8.83	1.16	1.69(L)	m	11	2.82	1.81	4.63	1.56	0.83(M_1)	m
3	4.58	1.78	6.36	2.57	1.15(M_2)	sm	12	3.14	1.48	4.62	2.12	0.83(M_1)	sm
4	4.04	2.15	6.19	1.88	1.12(M_2)	sm	13	2.32	2.30	4.62	1.01	0.83(M_1)	m
5	3.12	3.05	6.17	1.02	1.11(M_2)	m	14	2.26	2.02	4.28	1.12	0.77(M_1)	m
6	3.09	3.05	6.14	1.01	1.11(M_2)	m	15	2.71	1.48	4.19	1.83	0.75(M_1)	sm
7	4.12	2.02	6.14	2.04	1.11(M_2)	sm	16	2.36	1.81	4.17	1.30	0.75(S)	m
8	3.56	2.07	5.63	1.72	1.01(M_2)	sm	17	2.08	1.75	3.83	1.19	0.69(S)	m
9	2.79	2.76	5.56	1.01	1.00(M_1)	m	18	1.65	1.64	3.29	1.01	0.59(S)	m

注：全组染色体总长度 99.91m。



图 6-32　牛蒡子根尖细胞有丝分裂中期（$2n=36$）

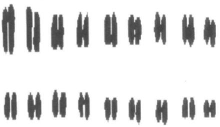


图 6-33　牛蒡子染色体核型

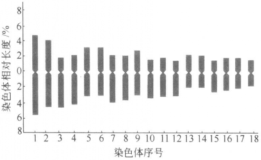


图 6-34　牛蒡子核型模式图

【附】 牛蒡子体细胞染色体数目为 $2n=36$。观察中未发现染色体数目的变异，也未见 B 染色体和随体。其染色体相对长度组成为：$2n=36=4L+12M_2+14M_1+6S$。核型公式为 $K(2n)=2x=36=22m+14sm$。

牛蒡子染色体总长度为 99.91μm，染色体长度的变异范围为 3.29～10.22μm，最长染色体与最短染色体之比为 3.11，大于 2 小于 4，臂比变异范围为 1.01～2.57，臂比大于 2 的染色体在整个染色体组中所占的比例为 0.22，因此根据 Stebbins 的核型分类标准应属 2B 型。染色体组的长臂总长为 58.3μm。按 Arano 的方法计算核型不对称系数（AS・K%），结果为 58.35%，核型较不对称。

12. 黄金菊

【来源】 本品为菊科植物黄金菊（*Hypochaeris grandiflora* Ledeb.）的干燥花。

【核型分析】

(1) 方法　取种子在 23℃温箱中培养。萌发种子的根尖在 4℃下饱和对二氯苯溶液中处理 4～6h，卡诺固定液处理 2～24h，然后在 60℃盐酸水解 10min，改良石炭酸品红染色，压片，镜检。

(2) 结果　染色体形态和核型如图版，核型模式图见图 6-35、图 6-36、表6-26。

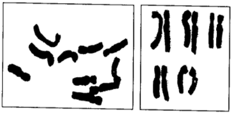


图 6-35　黄金菊染色体核型图

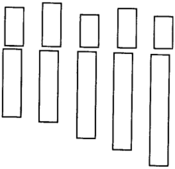


图 6-36　黄金菊核型模式图

表 6-26　黄金菊染色体参数

序　　号	相对长度/%			臂　　比	着丝点位置
	长　　臂	短　　臂	全　　长		
1	9.11	2.63	11.74	3.46	st
2	8.02	3.21	11.23	215	st
3	7.12	2.57	9.69	2.77	sm
4	5.84	3.33	9.17	1.75	sm
5	5.46	2.58	8.04	1.91	st

【附】 黄金菊染色体数目 $2n=10$，染色体总长度 49.87μm，有 2 对近中部着丝点，3 对近端部着丝点。核型公式为 $K(2n)=4sm+6st$，最长染色体/最短染色体=1.41。

13. 胡芦巴

【来源】 本品为豆科植物胡芦巴（*Trigonella foenum-graecum* L.）的干燥成熟种子。

【核型分析】

(1) 方法　在室温 20℃左右将试验种子置培养皿中培养。待根尖长至 0.5～1.0cm时，切下根尖，分别用 0.075%秋水仙碱溶液和 0.0035mol/L 8-羟基喹啉溶液，在低温 7℃左右预处理 1～5h。随后，用 2.5%纤维素酶和果胶酶混合酶液处理 0.5h，50% 乙醇固定 10min，0.2mol/L 盐酸解离 10min，45%醋酸软化2～4h，再分别用苯酚-品红、铁-醋酸洋红染色。常规压片，冰冻制片，中性树脂胶封藏。

(2) 结果　见表 6-27、图 6-37。

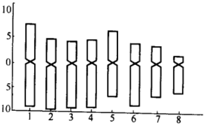


图 6-37　胡芦巴核型模式图

表 6-27 胡芦巴的核型分析

染色体序号	相对长度/%			臂比（长臂/短臂）	差值(*d*)（长臂-短臂）	着丝点指数 5(10−*d*)	着丝点位置
	长臂	短臂	总长				
1	9.06	7.64	16.7	1.19	1.42	42.9	m(sat)
2	9.91	4.49	14.4	2.21	5.42	22.9	sm
3	9.73	3.97	13.7	2.45	5.76	21.2	sm
4	8.81	4.49	13.3	1.96	4.32	28.4	sm
5	6.62	6.62	13.24	1.00	0.00	50.0	M
6	8.25	4.05	12.3	2.04	4.20	29.0	sm
7	6.18	3.82	10.0	1.62	2.36	38.2	m
8	5.40	1.80	7.2	3.00	3.60	32.0	sm

【附】 胡芦巴染色体数目为 $2n=16$，没有非整倍性变异和多倍体现象，有一对具随体染色体。核型公式为 $2n=2x=16=2M+2m+2m\ (sat)+10sm$。其中，第 5 对为正中部着丝粒染色体；第 1 对、第 7 对为中部着丝点染色体，第 1 对染色体长臂末端具随体；第 2 对、第 3 对、第 4 对、第 6 对、第 8 对为近中部着丝点染色体。染色体总长度为 100.84μm，最长染色体与最短染色体长度比为 2.32，臂比变异范围为 1.00～3.00。染色体核型为 2B 型。

14. 鸡冠花

【来源】 本品为苋科植物鸡冠花（*Celosia cristata* L.）的干燥花序。

【核型分析】

（1）方法 取种子浸泡于 60℃温水中搅拌，至 24℃左右时除去水分，放于培养皿内置 24℃恒温中培养。待根尖长至约 0.5cm 时，在室温下用 0.002mol/L 的 8-羟基喹啉液预处理 4h，水洗后用卡诺固定液固定 4～24h 再水洗，用1mol/L 的 HCl 溶液于 60℃恒温解离 5min，水洗，在卡宝液（改良石炭酸品红液）中压片，染色。镜检，取分散好的中期染色体制片，冰冻制片，干燥，中性树脂胶封片。

（2）结果 见图 6-38、图 6-39、表 6-28。

表 6-28 鸡冠花染色体核型分析数据

序　号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
短臂/μm	1.01	0.99	0.97	0.94	0.92	0.86	0.81	0.88	0.75	0.80	0.78	0.75	0.74	0.69	0.67	0.67	0.63	0.59
长臂/μm	1.28	1.18	1.14	1.07	1.06	1.06	1.08	0.97	1.04	0.96	0.95	0.91	0.87	0.85	0.83	0.75	0.74	0.70
全长/μm	2.29	2.17	2.11	2.01	1.98	1.92	1.89	1.85	1.79	1.76	1.73	1.66	1.61	1.54	1.50	1.42	1.37	1.29
相对长度/%	7.18	6.80	6.62	6.30	6.21	6.02	5.93	5.80	5.61	5.50	5.42	5.21	5.05	4.83	4.70	4.45	4.30	4.05
臂比	1.27	1.19	1.18	1.14	1.15	1.23	1.33	1.10	1.39	1.20	1.22	1.2	1.18	1.23	1.24	1.12	1.17	1.19
着丝粒指数	44.1	45.6	46.0	46.8	46.5	44.8	42.9	47.6	41.9	45.5	45.1	45.2	46.0	44.8	44.7	47.2	46.0	45.7
着丝点位置	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m	m

注：相对长度＝每条染色体全长/染色体组总长度×100；

臂比＝长臂/短臂；着丝粒指数＝短臂/全长×100。

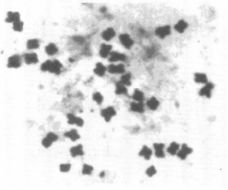


图 6-38　鸡冠花染色体核型

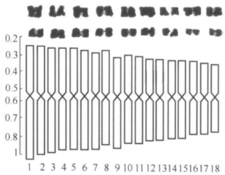


图 6-39　鸡冠花染色体核型模式图

【附】 鸡冠花的染色体数目为 $2n=36$。染色体核型公式为 $K(2n)=2x=36=36m$，在 18 对体细胞染色体中，臂比均在 1.5 以下，均为中部着丝点染色体。染色体组总长度为 31.89μm，变异范围为 1.29～2.29μm，最长染色体为最短染色体的 1.78 倍；臂比变异范围为 1.10～1.39。根据 Stebbins 的核型标准，鸡冠花属 1A 型，属对称核型。鸡冠花的染色体平均长度为 1.77μm，在 36 条染色体中，2μm 以上的仅 8 条。根据 Lima-De-Faria 的染色体场（Chromosoma field）理论，鸡冠花的染色体属第 2 集染色体，虽具有正常的着丝点和端粒，但二者相距太近，接近核型分析的禁区。

15. 马蔺

【来源】 本品为鸢尾科植物马蔺（*Iris lactea Pall. var. chinensis* (Fisch.) Koidz.）的干燥成熟种子。

【核型分析】

(1) 方法　取种子用浓硫酸处理 30min 后，放在铺有双层湿滤纸的培养皿中，在 25℃恒温箱中培养。当根长至 1.0～1.5cm 时截取 3～5mm 根尖，在室温下用 0.15%秋水仙碱液暗处理 3.5h，清洗秋水仙碱液，用卡诺固定液固定，再将材料转入 60℃预热过的 1mol/L 盐酸中解离 8min。除酸后于卡宝品红染色液中染色，染色后用混合酶液（2%纤维素酶-2%果胶酶，2∶1）在 37℃恒温下处理 1h。除去酶液，加卡诺固定液，再将材料用 45%醋酸分色后压片。采用冰冻法制片，二甲苯透明，中性树脂胶封片。

(2) 结果　见图 6-40、图 6-41、图 6-42、表 6-29、表 6-30。

【附】 马蔺的染色体数目为 $2n=32$。染色体平均长度为 3.53μm，相对长度组成为 $2n=32=6L+4M_2+18M_1+4S$。核型公式为 $K(2n)=32=22m+8sm+2T$。

马蔺染色体总长度为 56.43μm，长臂总长为 34.54μm，根据 Arano 的方法



图 6-40 马蔺根尖细胞中期（$2n=32$）

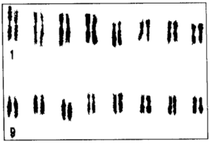


图 6-41 马蔺染色体核型

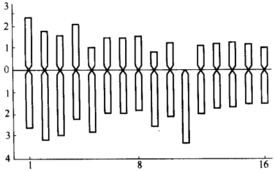


图 6-42 马蔺染色体核型模式图

表 6-29 马蔺染色体参数表

染色体编号	短臂	长臂 /μm	全长	相对长度 %	相对长度系数	臂比	着丝点位置	染色体类别
1	2.40	2.58	4.98	8.83	1.41	1.08	m	L
2	1.74	3.17	4.91	8.70	1.39	1.82	sm	L
3	1.53	2.95	4.48	7.94	1.27	1.93	sm	L
4	2.10	2.19	4.29	7.60	1.22	1.04	m	M_2
5	1.04	2.77	3.81	6.75	1.08	2.66	sm	M_2
6	1.51	1.91	3.42	6.06	0.97	1.26	m	M_1
7	1.52	1.88	3.40	6.03	0.96	1.24	m	M_1
8	1.60	1.76	3.36	5.95	0.95	1.10	m	M_1
9	0.88	2.45	3.33	5.90	0.94	2.78	sm	M_1
10	1.28	2.03	3.31	5.87	0.94	1.59	m	M_1
11	0.00	3.18	3.18	5.64	0.90	x	T	M_1
12	1.22	1.85	3.07	5.44	0.87	1.52	m	M_1
13	1.29	1.59	2.88	5.10	0.82	1.23	m	M_1
14	1.34	1.52	2.86	5.07	0.81	1.13	m	M_1
15	1.28	1.37	2.65	4.70	0.75	1.07	m	S
16	1.16	1.34	2.50	4.43	0.71	1.16	m	S

注：染色体总长度为 56.43μm。

表 6-30 马蔺染色体体积

染色体编号	染色体长度/μm	染色体宽度/μm	染色体体积 /μm^3
1	4.98	0.93	3.38
2	4.91	0.79	2.41
3	4.48	1.01	3.59
4	4.29	1.04	3.64
5	3.81	0.82	2.01
6	3.42	0.80	1.72
7	3.40	0.96	2.48
8	3.36	0.94	2.33
9	3.33	0.91	2.16
10	3.31	0.85	1.88
11	3.18	0.86	1.85
12	3.07	0.72	1.25
13	2.88	0.84	1.60
14	2.86	0.95	2.03
15	2.65	0.78	1.27
16	2.50	0.83	1.35

注：染色体总体积 34.95μm^3。

计算核型不对称系数（AS・K%）结果是 61.21%，对称程度较高，16 对染色体长度变化范围在 2.50～4.98μm 之间，最长染色体与最短染色体之比为 1.99：1，臂比值变化范围在 1.04～∞，其中有 3 对染色体臂比值大于 2，为全组染色体的 18.75%，核型分类属于 2A 型。染色体体积变化范围在 1.25～3.64μm^3 之间，染色体总体积为 34.95μm^3。

16. 毛酸浆

【来源】 本品为茄科植物毛酸浆（*Physalis pubescens* L.）的带萼果实或全草。

【核型分析】

（1）方法 取种子放在经水浸湿的铺有双层滤纸的培养皿中，用纱布覆盖，置 28℃的培养箱中培养。当胚根长至 0.5～1.0cm 时取材，在温室下用 0.1%、0.15%或 0.20%的秋水仙碱液暗处理 3h、4h 后反复清洗干净，用卡诺固定液固定 2～15h，转入 70%乙醇（4℃左右）中保存。

解离前先用蒸馏水清洗约 10min，转入预热恒温 60℃的 1mol/L 盐酸解离液中解离 6.5min，洗去残留的盐酸，然后切取 1～2mm 根尖，放在白瓷盘中，用混合酶液（1.5%纤维素酶-1.5%果胶酶，1：1）在室温下解离 4h，洗净残留的酶液，加卡宝染色液染色 18h 以上。制片时用 45%的冰醋酸分色 2～3min，冰冻法及加拿大树脂胶封片。选择染色体形态清晰并分散良好的中期细胞进行显微摄影及分析。

（2）结果 见图 6-43、图 6-44、图 6-45、表 6-31、表 6-32。



图 6-43 毛酸浆体细胞分裂中期（$2n=24$）

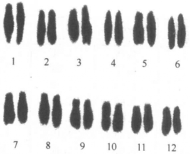


图 6-44 毛酸浆染色体核型图

【附】 毛酸浆体细胞染色体数目为 $2n=24$。染色体平均长度为 1.40μm，相对长度组成为 $2n=24=10M_2+14M_1$。核型公式是 K（$2n$）为 24＝2m＋20sm＋2st。

染色体总长度为 17.41μm，长臂总长为 12.04μm，根据 Arano 的计算方法，

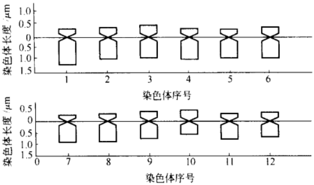


图 6-45　毛酸浆染色体核型模式图

表 6-31　毛酸浆染色体参数

染色体编号	染色体长度(μm)			相对长度/%	相对长度系数	臂比(L/S)	着丝点位置	染色体类别
	长臂	短臂	全长					
1	1.39	0.42	1.81	10.40	1.25	3.31	sm	M_1
2	1.11	0.49	1.60	9.2	1.10	2.27	sm	M_2
3	1.01	0.58	1.59	9.13	1.10	1.74	sm	M_2
4	1.09	0.43	1.52	8.73	1.05	2.53	sm	M_2
5	1.07	0.40	1.47	8.44	1.01	2.68	sm	M_2
6	0.96	0.50	1.46	8.39	1.01	1.92	sm	M_2
7	1.10	0.31	1.41	8.10	0.97	3.55	st	M_1
8	1.02	0.38	1.40	8.04	0.97	2.68	sm	M_1
9	0.90	0.47	1.37	7.87	0.94	1.91	sm	M_1
10	0.72	0.58	1.30	7.47	0.90	1.24	m	M_1
11	0.87	0.37	1.24	7.12	0.86	2.35	sm	M_1
12	0.80	0.44	1.24	7.12	0.86	1.82	sm	M_1

表 6-32　毛酸浆染色体体积

染色体编号	染色体宽度/μm	染色体长度/μm	染色体体积/μm^3	染色体编号	染色体宽度/μm	染色体长度/μm	染色体体积/μm^3
1	0.76	1.81	3.28	8	0.90	1.40	3.53
2	0.75	1.60	2.82	9	0.86	1.37	3.18
3	0.89	1.59	3.95	10	0.71	1.30	2.05
4	0.68	1.52	2.21	11	0.81	1.24	2.54
5	0.90	1.47	3.12	12	0.88	1.24	3.00
6	0.60	1.46	1.63	Σ		17.41	34.98
7	0.91	1.41	3.67				

核型不对称系数（AS·K%）为 69.16%。12 对染色体长度变化范围在 1.24～1.81μm间，最长染色体与最短染色体之比是 1.46∶1，臂比值变化范围在1.24～3.55，其中 7 对染色体臂比大于 2，为全组染色体的 58.33%，根据 Stebbins 的核型分类标准，毛酸浆的核型属于 3A 型。

染色体体积变化范围 1.63～3.95μm^3 间，全组染色体总体积为 34.98μm^3。

17. 鬼针草

【来源】 本品为菊科植物鬼针草（*Bidens bipinnata* L.）的全草。

【核型分析】

（1）方法 取种子放在铺有滤纸的培养皿内，用水润湿，置于25℃恒温箱内培养，胚根长至1cm左右将其截取，在室温下用质量分数为0.15%的秋水仙碱液暗处理3.5h，经清洗后用卡诺固定液（无水乙醇-冰醋酸，3∶1）固定24h后，再经清洗，转入预热恒温60℃的1mol/L盐酸中解离7min。反复冲洗1h，用改良石炭酸品红染色，再用质量分数为2%的纤维素酶处理75min，经醋酸分色后压片。采用冰冻法制片，于37℃恒温干燥，经二甲苯透明后中性树脂胶封片。

（2）结果 见图6-46、图6-47、图6-48、表6-33、表6-34。

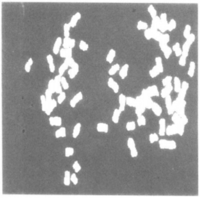


图6-46 鬼针草根尖细胞中期（$2n=72$）

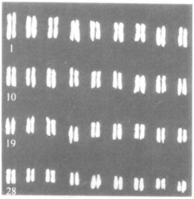


图6-47 鬼针草核型图

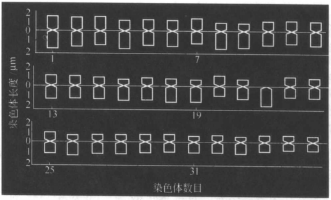


图6-48 鬼针草核型模式图

【附】 鬼针草体细胞染色体数目为$2n=72$。鬼针草的染色体平均长度为2.32μm，相对长度组成为$2n=72=8L+26M_2+34M_1+4S$。

表 6-33　鬼针草染色体参数

染色体编号	染色体长度 短臂＋长臂	相对长度 /%	相对长度系数	臂比(长臂/短臂)	着丝点位置， 染色体类型
1	1.48＋1.97＝3.45	4.14	1.49	1.33	mL
2	1.32＋1.77＝3.09	3.70	1.33	1.34	mL
3	1.36＋1.62＝2.98	3.57	1.28	1.19	mL
4	1.04＋1.94＝2.98	3.57	1.28	1.87	smL
5	1.16＋1.73＝2.89	3.46	1.25	1.49	mM_2
6	1.03＋1.79＝2.82	3.38	1.22	1.74	smM_2
7	1.16＋1.55＝2.71	3.25	1.17	1.34	mM_2
8	0.67＋2.04＝2.71	3.25	1.17	3.04	stM_2
9	0.73＋1.95＝2.68	3.21	1.16	2.67	smM_2
10	0.88＋1.70＝2.58	3.09	1.11	1.93	smM_2
11	0.99＋1.58＝2.57	3.08	1.11	1.60	mM_2
12	0.80＋1.74＝2.54	3.05	1.10	2.18	smM_2
13	1.09＋1.43＝2.52	3.02	1.09	1.31	mM_2
14	0.99＋1.38＝2.37	2.84	1.02	1.39	mM_2
15	0.91＋1.45＝2.36	2.83	1.02	1.59	mM_2
16	0.70＋1.66＝2.36	2.83	1.02	2.37	smM_2
17	0.75＋1.60＝2.35	2.82	1.01	2.13	smM_2
18	0.56＋1.77＝2.33	2.79	1.00	3.16	stM_1
19	0.49＋1.76＝2.25	2.70	0.97	3.59	stM_1
20	1.04＋1.13＝2.17	2.60	0.94	1.09	mM_1
21	0.68＋1.48＝2.16	2.59	0.93	2.18	smM_1
22	0.00＋2.16＝2.16	2.59	0.93	∞	M_1
23	0.83＋1.30＝2.13	2.55	0.92	1.57	mM_1
24	0.70＋1.42＝2.12	2.54	0.91	2.03	smM_1
25	0.99＋1.10＝2.09	2.50	0.90	1.11	mM_1
26	0.65＋1.41＝2.06	2.47	0.89	2.17	smM_1
27	0.75＋1.23＝1.98	2.37	0.85	1.64	mM_1
28	0.73＋1.25＝1.98	2.37	0.85	1.72	smM_1
29	0.76＋1.17＝1.93	2.31	0.83	1.54	mM_1
30	0.80＋1.05＝1.85	2.22	0.80	1.31	mM_1
31	0.67＋1.15＝1.82	2.18	0.78	1.72	smM_1
32	0.65＋1.16＝1.81	2.17	0.78	1.78	smM_1
33	0.52＋1.26＝1.78	2.13	0.77	2.42	smM_1
34	0.69＋1.08＝1.77	2.12	0.76	1.57	mM_1
35	0.63＋0.91＝1.54	1.85	0.66	1.44	mS
36	0.59＋0.93＝1.52	1.82	0.66	1.58	mS

注：鬼针草染色体总长度 83.41μm。

其核型公式为 $K(2n)=6x=72=36m+28sm+6st+2t$。鬼针草染色体组染色体总长为 83.41μm，长臂总长 53.62μm，根据 Arano 的计算方法，核型不对称系数（AS·K%）为 64.28%，对称程度较高。36 对染色体的长度变化范围在 1.52～3.45μm 间，最长染色体与最短染色体之比是 2.27∶1，臂比值变化范围是 1.09～∞，其中 12 对染色体臂比大于 2，为全组染色体的 33.3%，核型分类属于 2B 型。

表 6-34　鬼针草染色体体积

染色体编号	染色体宽度/μm	染色体长度/μm	染色体体积/μm^3	染色体编号	染色体宽度/μm	染色体长度/μm	染色体体积/μm^3
1	1.20	3.45	3.90	19	1.34	2.25	3.18
2	1.35	3.09	4.42	20	1.15	2.17	2.23
3	1.16	2.98	3.15	21	1.17	2.16	2.33
4	1.15	2.98	3.05	22	1.18	2.16	2.36
5	1.22	2.89	3.37	23	1.11	2.13	2.06
6	1.38	2.82	4.22	24	1.33	2.12	2.94
7	1.25	2.71	3.34	25	1.31	2.09	2.79
8	1.20	2.71	3.04	26	1.07	2.06	1.85
9	1.18	2.68	2.93	27	1.04	1.98	1.68
10	1.30	2.58	3.40	28	1.25	1.98	2.43
11	1.17	2.57	2.74	29	1.19	1.93	2.13
12	1.25	2.54	3.09	30	1.29	1.85	2.42
13	1.09	2.52	2.35	31	1.16	1.82	1.92
14	1.24	2.37	2.58	32	1.28	1.81	2.33
15	1.17	2.36	2.54	33	1.12	1.78	1.75
16	1.24	2.36	2.85	34	1.25	1.77	2.17
17·	1.25	2.35	2.87	35	1.24	1.54	1.86
18	1.17	2.33	2.61	36	1.32	1.52	2.08

注：鬼针草染色体总体积 96.96μm^3。

染色体体积变化范围在 1.68～4.42μm^3 间，全组染色体总体积为 96.96μm^3。

二、其他植物类中药的鉴定

1. 甘草

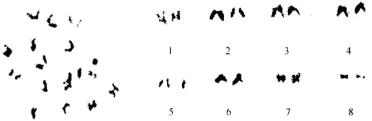
【来源】 本品为豆科植物甘草（*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.）、胀果甘草（*Glycyrrhiza inflata* Bat.）或光果甘草（*Glycyrrhiza glabra* L.）的干燥根及根茎。

【核型分析】

（1）方法　取甘草种子用浓硫酸浸泡 50min，再置 25℃温箱内萌发。酶解去壁，用 2.5%混合酶液在 25℃下处理 18～20h。制备染色体标本片，进行核型分析。

（2）结果　见图 6-49、图 6-50、表 6-35。

【附】 甘草的体细胞染色体数为 $2n=16$。核型公式为 $K(2n)=2x=16=2m+14t$。甘草染色体的总长度为 19.38μm，最长染色体 2.88μm，最短染色体 1.05μm，最长和最短染色体比值为 2.74，臂比大于 2 的染色体有 7 对，占 87.5%。本种核型为 3B 型，即比较不对称。



(a) 根尖细胞中期染色体形态　　　　(b) 染色体核型

图 6-49　甘草的染色体图

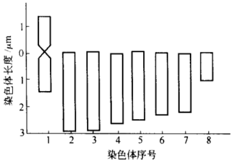


图 6-50　甘草染色体核形模式图

表 6-35　甘草染色体长度、臂比和类型

编号	绝对长度/μm			相对长度/%	臂比(长/短)	着丝点位置
	长臂	短臂	全长			
1	1.43	1.38	2.81	14.50	1.04	m
2	2.88	0	2.88	14.86	∞	t
3	2.87	0	2.87	14.81	∞	t
4	2.71	0	2.71	13.98	∞	t
5	2.52	0	2.52	13.00	∞	t
6	2.41	0	2.41	12.44	∞	t
7	2.13	0	2.13	10.99	∞	t
8	1.05	0	1.05	5.42	∞	

2. 麦冬

【来源】 本品为百合科植物麦冬［*Ophiopogon japonicus*（Thunb.）Ker-Gawl.］的干燥块根。

【核型分析】

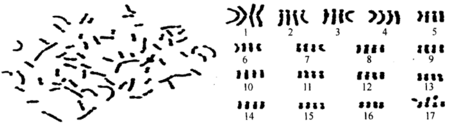
（1）方法　采用改进的染色体去壁低渗法。从幼苗上取其旺盛生长的根尖，以 0.002mol/L 8-羟基喹啉溶液预处理 4h，固定过夜，3%混合酶液解离 3～4h，蒸馏水中后低渗 15min，再固定 30min，于洁净冰冻载片上涂片，5%Giemsa 染

色 5min，流水冲洗，空气干燥，镜检观察。

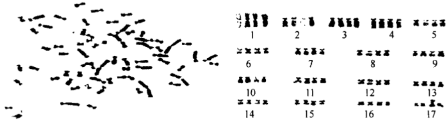
（2）结果　见表 6-36、图 6-51。

表 6-36　川麦冬主要核型特征

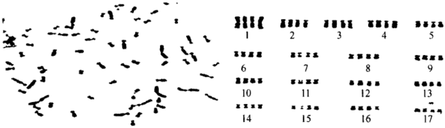
类型	相对长度范围/%	最长染色体/最短染色体	平均臂比值	核型公式	核型类别
大叶型	13.04～3.18	4.12	2.08	$2n=68=32m(4sat)+24sm+12st$	2C
小叶型	12.54～2.95	4.25	1.88	$2n=68=32m(2sat)+24sm+12st$	2C
直立型	12.08～3.24	3.73	1.77	$2n=68=40m(2sat)+20sm+8st$	2B



(a) 大叶型



(b) 小叶型



(c) 直立型

图 6-51　川麦冬染色体核型图

【附】 川麦冬的染色体数的数目 $2n=68$。可排序为：直立型→小叶型→大叶型。川麦冬 3 种核型中随体的高度杂合性：大叶型 3 个中间随体和一个长臂小随体；小叶型与直立型均为 1 个中间随体和一个长臂小随体。

3. 石蒜

【来源】 本品为石蒜科植物红花石蒜［*Lycoris radiata*（L.）Herb.］、紫

花石蒜（*Lycoris squamigera* Maxim.）、黄花石蒜（*Lycoris aurea* Herb.）的干燥鳞茎。

【核型分析】

（1）方法　将石蒜的鳞茎水培发根，待幼根长至 1.5cm 左右时剪下，置于饱和对二氯苯中预处理 3～5h，卡诺氏液固定 20～24h，转入 70%的酒精中，保存于冰箱中备用，储存的根尖用蒸馏水洗净后，转入 1mol/L HCl 溶液 60℃离析 6min，50%乙醇清洗数次后切取根尖，改良的石炭酸品红液染色 2h 以上，45%的冰醋酸压片，共观察 50 个以上中期细胞，选取分散良好的分裂相拍照。

（2）结果　见图 6-52、表 6-37。



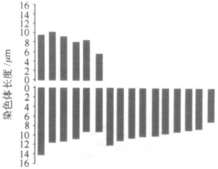


图 6-52　石蒜染色体形态及核型模式图

表 6-37　中国石蒜染色体形参数

染色体序号	绝对长度/μm			相对长度/%	臂比	着丝点位置
	短　臂	长　臂	全　长			
1	9.40	14.30	23.70	11.06	1.52	m
2	10.10	11.80	21.90	10.22	1.17	m
3	9.10	11.30	20.40	9.52	1.24	m
4	7.90	10.80	18.70	8.73	1.37	m
5	8.30	9.10	17.40	8.12	1.10	m
6	5.60	9.30	14.50	6.77	1.66	m
7	0	12.20	12.20	5.70	∞	T
8	0	11.00	11.00	5.14	∞	T
9	0	10.70	10.70	5.00	∞	T
10	0	10.40	10.40	4.86	∞	T
11	0	10.10	10.10	4.72	∞	T
12	0	9.60	9.60	4.48	∞	T
13	0	9.20	9.20	4.30	∞	T
14	0	8.90	8.90	4.15	∞	T
15	0	8.60	8.60	4.01	∞	T
16	0	6.90	6.90	3.22	∞	T

【附】 石蒜的染色体数为 $2n=16$。核型公式为 $2n=6m+10T$，未见随体。最长染色体长度与最短染色体长度比为 3.43。属于 3B 核型。

三、动物类中药的鉴定

1. 麝香

【来源】 本品为鹿科动物林麝（*Moschus berezovskii* Flerov.）、马麝（*Moschus sifanicus* Przewalski.）或原麝（*Moschus moschiferus* Linnaeus.）成熟雄体香囊中的干燥分泌物。

【核型分析】

（1）方法

① 外周血淋巴细胞的培养及染色体的制备　从林麝耳静脉取外周血 0.3～0.4mL，接种在 5mL 综合培养基中，培养基组成为：RPM 116404mL、小牛血清 1mL、植物血球凝集素（phytohemagglutinin，PHA）和伴刀豆球蛋白（concanavalinA，ConA）各 40μg、肝素钠（10mg/mL）0.05mL、青霉素和链霉素适量，pH7.0～7.2，38℃培养 65h，在培养终止前 10h 加入秋水仙素至终浓度 0.01μg/mL。继续培养 10h 后，离心收集细胞，常规空气干燥法制备染色体。

② G-带的显示　空气干燥法制备的染色体在 37℃温箱内预处理 3h，用 0.025%胰蛋白酶溶液处理 45s，GKN 液漂洗 30s，10%Giemas 磷酸缓冲液染色 10min，自来水细流冲洗，空气干燥、镜检。

（2）结果　见表 6-38、图 6-53、图 6-54。

表 6-38　林麝染色体相对长度

染色体数	相对长度/%	着丝粒位置	染色体数	相对长度/%	着丝粒位置
1	5.09±0.07	t	16	3.16±0.17	t
2	4.65±0.23	t	17	3.11±0.18	t
3	4.54±0.04	t	18	2.95±0.18	t
4	4.50±0.01	t	19	2.93±0.02	t
5	4.46±0.09	t	20	2.88±0.01	t
6	4.35±0.09	t	21	2.76±0.04	t
7	4.29±0.03	t	22	2.75±0.03	t
8	4.25±0.01	t	23	2.66±0.01	t
9	4.09±0.01	t	24	2.57±0.01	t
10	3.87±0.06	t	25	2.56±0.01	t
11	3.74±0.02	t	26	2.42±0.01	t
12	3.63±0.03	t	27	2.39±0.03	t
13	3.57±0.47	t	28	2.20±0.02	t
14	3.42±0.01	t	X	5.17±0.13	t
15	3.21±0.29	t	Y	2.10±0.01	t

注：t 表示端着丝染色体（telocentric chromosome）。

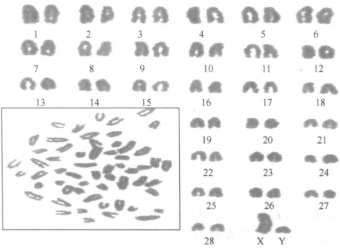


图 6-53　林麝核型（中期分裂相）

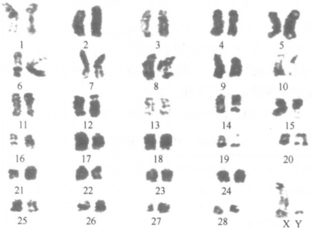


图 6-54　林麝染色体 G 带带型

【附】 林麝核型是 $2n=58$。林麝染色体类型：染色体在末端连接在一起，看不出明显的短臂，所以，根据 Levan 的划分标准，林麝染色体均为端着丝粒染色体。

林麝染色体 G 带带型：通过空气干燥法制备的染色体用 0.025％的胰蛋白酶处理 45s，能够得到比较好的 G 带带型，证实最长的一条染色体是 X 染色体，最短的一条染色体是 Y 染色体。根据 G 带带型结果，可以把林麝 58 条染色比较准确地进行配对。由于林麝所有染色体着丝粒位置都是在端部，而且染色体大小呈现连续的递减变化，因此，根据 G 带带型进行染色体配对的结果将更为可靠。

2. 南草蜥

【来源】 本品为蜥蜴科动物南草蜥（*Takydromus Sexlineatus meridionalis* Gunther.）的干燥全体。

【核型分析】

（1）方法

① 染色体制备　采用常规空气干燥法，质量分数为10%Giemsa液染色15min。统计100个细胞中期分裂相，确定二倍体细胞染色体数目。对10个分散好，染色体形态好的分裂相进行拍照，然后对各分裂相进行染色体长度测量。依照Levan等的标准确定着丝粒的位置，将染色体按大小依次排列，得出南草蜥核型。

② 带显示法　依据郭超文等的方法进行。选10个带型清晰，分散良好的分裂相进行拍照，依据照片和镜下观察进行G带分析。

（2）结果　见图6-55、图6-56、表6-39。

表6-39　南草蜥核型分析数据

染色体		相对长度/%		着丝点位置	染色体		相对长度/%		着丝点位置
组	序号	$\bar{x}\pm S\bar{x}$	范围		组	序号	$\bar{x}\pm S\bar{x}$	范围	
A	1	8.94±0.23	8.10～10.01	st	B	10	4.78±0.14	4.39～4.97	st
	2	8.12±0.12	7.52～8.62	T		11	4.40±0.14	3.94～4.60	T
B	3	7.44±0.14	6.87～7.68	T		12	4.16±0.15	3.59～4.60	st
	Z	6.95±0.14	6.54～7.24	st		13	3.98±0.14	3.51～4.37	st
	4	6.76±0.14	6.41～7.02	st		14	3.79±0.13	3.45～3.92	T
	5	6.50±0.15	6.03～6.89	T		15	3.54±0.15	2.95～3.79	st
	6	6.10±0.15	5.63～6.65	st		16	3.31±0.14	2.81～3.54	T
	7	5.86±0.15	5.40～6.15	T		17	3.12±0.16	2.48～3.38	st
	8	5.51±0.14	5.08～5.70	st	C	18	2.27±0.15	1.72～2.63	st
	9	5.20±0.14	4.83～5.41	st		W	1.64±0.15	0.18～1.95	T

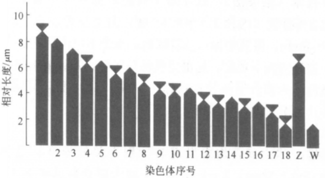


图6-55　南草蜥染色体模式图

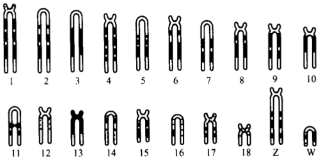


图 6-56　南草蜥 G 带染色体模式图

深染暗带；浅染暗带

〖附〗 通过对 4 只南草蜥（雌雄各 2 只）100 个骨髓细胞中期分裂相染色体数目统计发现，$2n=38$ 的细胞占统计细胞总数的 71%，$2n$ 等于其他数目的细胞占 29%，因此可确定其二倍体染色体数目为 38，其中常染色体 18 对，性染色体 1 对，雌性为 ZW，雄性为 ZZ。

3. 水城棘腹蛙

〖来源〗 本品为蛙科动物棘腹蛙（*Rana boulengeri* Gunther.）的全体。

〖核型分析〗

（1）方法

染色体制片：供试动物按 5～8μg/g 体重的剂量腹腔注射秋水仙碱溶液（1500μg/mL）；14～16h 后处死动物，取出后股骨，用 0.1046mol/L KCl 溶液冲出骨髓，低渗 30～35min，离心 7min（1000r/min），用新配制的甲醇-冰乙酸（3∶1）固定液固定两次，每次 20～30min，再离心，吸去大部分上清液，再加入1～2mL固定液混匀制成细胞悬液，在冰水玻片上滴片，室温中空气干燥。用于核型分析的标本片，以 20% Giemsa 染液（1/15mol/L 磷酸缓冲液配制，pH7.2）染色 30min，流水冲洗后室温中空气干燥。

Ag-NOR 技术（银染法）：取片龄 1 周内的标本片，滴加 50%（500g/L）$AgNO_3$ 6 滴和 2%明胶（内含 1%甲酸）3 滴，覆盖以大小合适的擦镜纸；放入 65℃温箱中 5～8min，待其变为棕色后取出，双蒸水冲洗后室温中空气干燥。标本片制成后，在显微镜下观察，选出染色体分散好，带纹清晰的分裂相各 10 个；油镜下拍摄染色体和镜台测微尺；将标本尺放大 1500 倍，同倍数下放大照片，测量各染色体的绝对长度，计算相对长度和臂比，剪贴。

（2）结果：见表 6-40，见图 6-57。

〖附〗 雌雄个体之间，均未发现与性别有关的异型染色体。核型公式：$2n=2x=26=14m+12sm$，5＋8 模式（5 对大型染色体和 8 对小型染色体），NF＝52。

表 6-40　棘腹蛙的核型数据（X±SE）

染色体序号	相对长度	臂比	着丝粒位置	染色体序号	相对长度	臂比	着丝粒位置
1	16.02±0.60	1.28±0.08	m	8	5.40±0.07	1.88±0.12	sm
2	12.93±0.47	2.21±0.14	sm	9	5.07±0.14	1.86±0.06	sm
3	11.34±0.36	2.03±0.11	sm	10	4.76±0.17	1.89±0.07	sm
4	10.56±0.29	1.79±0.05	sm	11	4.46±0.25	1.40±0.11	m
5	9.52±0.30	1.40±0.06	m	12	4.20±0.28	1.17±0.04	m
6	6.28±0.17	1.31±0.07	m	13	3.80±0.28	1.61±0.10	m
7	5.65±0.05	1.35±0.06	m				

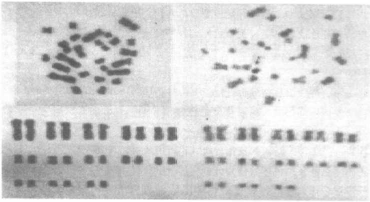


图 6-57　水城棘腹蛙染色体银染照片

贵州水城棘腹蛙与四川和云南棘腹蛙相比，核型和银带都有一些差异。水城产棘腹蛙的 Ag-NOR 只有一个或两个，可能就是这种剂量补偿效应的结果，表明核仁染色体之间，可能有不同的强度。

Ag-NOR 技术是特异显著显示核仁组织区（NOR）区域的有效方法之一，现已证明 Ag-NOR 即 18s＋28srDNA 的分布区。在许多物种中，Ag-NOR 与该物种的次缢痕有关，即次缢痕＝NOR＝rDNA。认为 Ag-NOR 具有剂量补偿效应，即当一个 NOR 是较强大时，其他的 NOR 就不活动，由活化状态进入潜伏状态；当主要的 NOR 由于某种原因失活时，其他的 NOR 就会活动起来，由潜伏态进入活化态。

参　考　文　献

1　简永兴，马英姿，彭映辉等．枸杞的染色体核型分析［J］．中国中药杂志，1997，22（9）：532～533，575

2　张虹，罗鹏．四川几种常见五味子的核型研究［J］．西南农业大学学报，2000，22（2）：177～190

3　李兰，刘东周，杨家民等．牛蒡子的染色体研究［J］．山东中医学院学报，1996，20（3）：208～210

4 葛喜珍，彭士琪，王永蕙. 酸枣的染色体核型分析［J］. 河北林果研究，1997，12（4）：343～346
5 刘丽莎. 菟丝子和大菟丝子核型的比较研究［J］. 中草药，2000，31（10）：784～787
6 王冰，朴文玉. 续随子的核型分析［J］. 中药材，1996，19（9）：435～437
7 杨兆起，程尧楚，魏爱华. 栀子染色体核型带型研究［J］. 中国中药杂志，1995，20（10）：588～590，638
8 周俊英. 中药月见草的染色体数目和核型分析［J］. 山东科学，2004，17（1）：30～31
9 杨德奎，孙京田，苗明升. 白刺的核型研究［J］. 山东师大学报（自然科学版），1997，12（1）：80～82
10 王冰，杨怀林，郑太坤. 金挖耳的核型分析［J］. 中药材，1999，22（4）：163～165
11 王冰，白云，陈连庚. 扁茎黄芪染色体的核型分析［J］. 中药材，25（8）：541～543
12 关贺群，路芳，姜传明. 东北产黄金菊核型分析［J］. 农垦师专学报，1997，1：99～100
13 张荣，赵艳晖. 胡芦巴核型分析［J］. 中药材，1996，19（8）：381～382
14 李允尧，李爱国，郑德顺. 鸡冠花染色体核型分析［J］. 山东医科大学学报，1996，34（1）：80～81
15 王冰，徐岩，郑太坤. 马蔺的核型分析［J］. 中药材，1998，21（5）：217～219
16 许亮，王冰. 毛酸浆染色体的核型分析［J］. 中药材，2004，27（4）：238～239
17 王冰，徐泽红，郑太坤. 鬼针草染色体的检测与分析［J］. 中国药学杂志，1997，32（7）：398～401
18 刘丽莎，张西玲. 甘草的染色体核型分析［J］. 中草药，1991，22（9）：417～418
19 梁国鲁，杨美全，阎勇. 川麦冬核型分析［J］. 西南农业大学学报，1998（8）：308～310
20 余本祺，王影，周守标. 安徽省中国石蒜的核型研究［J］. 皖西学院学报，2004，（2）：30～32
21 邹方东，岳碧松，张义正等. 林鹿染色体制备方法及核型与G带带型研究［J］. 兽类学报，2004，24（2）：115～120
22 胡启平，接燕荣. 南草蜥的核型和G带带型分析［J］. 广西医科大学学报，1999，16（2）：137～139

（李仁伟，陆景珊，王奕洁，常立军，张贵君）

第七章　DNA遗传标记鉴定法

第一节　基本理论

一、遗传标记

遗传标记（genetic marker）是遗传物质易于识别的表现形式。它具有两个基本特征，即可遗传性和可识别性，因此生物的任何有差异表型的基因突变型均可作为遗传标记。遗传标记包括形态标记（morphological marker）、细胞标记（cytological marker）、生化标记（biochemical marker）和分子标记（molecular marker）。

形态标记是指生物特定的肉眼可见的外部特征及特性，如植物的株高、叶形、花的颜色、千粒重等，广义上也包括与生殖生理特性、抗病抗虫性等有关的标记。由于形态标记简单直观、容易观察记载，所以长期以来对物种的分类鉴定都是以形态标记为主要的或初步的指标。形态标记数量较少，遗传表达有时不太稳定，易受环境条件及基因显隐性的影响。

细胞标记即染色体的变异，包括染色体核型和带型的变化。核型是指染色体相对长度、臂指数、着丝粒指数、染色体臂数等染色体特征；带型是指将染色体制片用不同物化手段处理，再用不同染料染色，在荧光激发下染色体臂会显示出不同的带数，如G带（giemsa banding）、C带（constitutive heterochromatin banding）、N带（nucleolar organizer region banding）等，可明确鉴别许多物种核型中的任一条染色体。与形态标记相比，细胞标记的优点是能够进行一些重要染色体或染色体区域定位。但是细胞标记材料需花费较大的人力和较长时间来培育，难度大，某些物种对染色体变异反应敏感，还有些变异难以用细胞学方法进行检测。

生化标记主要包括同工酶和等位酶标记，是从蛋白质水平来反映物种的遗传变异。同工酶是指一个以上基因座位编码的酶的不同形式；等位酶是指由一个基因座位的不同等位基因编码的酶的不同分子形式，同工酶和等位酶具有组织、发育及物种的特异性。生化标记技术方法是首先获得蛋白粗提物，然后通过电泳和组织化学染色法将酶的多种形式转变成肉眼可辨的酶谱带型。与形态标记、细胞学标记相比，生化标记直接反映了基因产物差异，受环境影响较小。但是由于酶

的表达存在阶段特异性和器官特异性，因此可真正利用的位点不多，而且有些酶的染色方法和电泳技术有一定难度，因此其实际应用受到一定限制。

分子标记是指能反映生物个体或种群间基因组中某种差异特征的 DNA 片段，它直接反映基因组 DNA 间的差异。与上述三种标记相比较，分子标记具有许多明显的优越性，表现如下。①直接以 DNA 的形式表现，在生物体的各个组织、各个发育阶段均可检测到，不受季节、环境限制，不存在表达与否等问题。②数量极多，遍布整个基因组，可检测座位几乎无限。③多态性高，自然界存在许多等位变异，无须人为创造。④表现为中性，不影响目标性状的表达。⑤许多标记表现为共显性的特点，能区别纯合体和杂合体，提供完整的遗传信息。目前分子标记已广泛应用于分子遗传图谱的构建，遗传多样性分析与种质鉴定，基因定位，转基因生物鉴定，分子标记辅助育种选择等方面。分子标记多态性丰富、遗传稳定、受组织和环境影响较小，因此分子标记越来越受到人们的重视。

二、分子标记

分子标记大多以电泳谱带的形式表现，大致可分为三大类。第一类是以分子杂交为核心的分子标记，包括限制性片段长度多态性（restriction fragment length polymorphism，RFLP）标记、DNA 指纹（DNA fingerprint）技术、原位杂交（in situ hybridization）等；第二类是以聚合酶链反应（polymerase chain reaction，PCR）为核心的分子标记技术，包括随机扩增多态性 DNA（random amplified polymorphism DNA，RAPD）标记、简单序列重复（simple sequence repeat，SSR）标记、扩增片段长度多态性（amplified fragment length polymorphism，AFLP）标记等；第三类是基于高通量检测技术的新型的分子标记，例如，单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism，SNP）、表达序列标签（expressed sequences tags，EST）等。理想的分子标记应达到以下几个要求：①具有高的多态性；②共显性遗传，即利用分子标记可鉴别二倍体中杂合和纯合基因型；③能明确辨别等位基因；④遍布整个基因组；⑤除特殊位点的标记外，要求分子标记均匀分布于整个基因组；⑥选择中性（即无基因多效性）；⑦检测手段简单、快速（如实验程序易自动化）；⑧开发成本和使用成本尽量低廉；⑨在实验室内和实验室间重复性好（便于数据交换）。但是，目前发现的任何一种分子标记还不能满足以上所有要求。

（一）以分子杂交为核心的标记

1. 限制性片段长度多态性

特定生物类型的基因组 DNA 经限制性内切酶完全酶解会产生分子量不同的同源等位片段（或称限制性等位片段）。RFLP 标记技术的基本原理就是通过电泳方法来分离和检测这些片段。凡是可以引起酶解位点变异的突变均可导致限制

性等位片段的变化，从而产生 RFLP 的变化。RFLP 标记包括以下基本步骤：DNA 提取；用 DNA 限制性内切酶消化；凝胶电泳分离限制性片段；将这些片段按原来的顺序和位置转移到易操作的滤膜上；用放射性同位素或非放射性物质标记的 DNA 作探针与膜上的 DNA 杂交（Southern blotting）；放射性自显影或酶学检测显示出不同材料对该探针的限制性酶切片段多态性。RFLP 标记的主要特点有：①遍布于整个基因组，数量几乎是无限的；②无表型效应，不受发育阶段及器官特异性限制；③共显性，可区分纯合子和杂合子；④结果稳定、可靠；⑤DNA 需要量大，检测技术繁杂，难以用于大规模的育种。

2. DNA 指纹技术

真核生物基因组中存在 2 个以上的重复序列首尾相连构成特定的染色体区段，根据重复单位大小和次数可分为卫星 DNA（satellite DNA），重复单位一般为几百至几千个碱基，通常分布在染色体异染色质区，具有高度物种特异性，可用于染色体和染色体片段的鉴定；小卫星 DNA（minisatellite DNA）或不同数目的串联重复（variable number of tandem repeat，VNTR）和微卫星 DNA（microsatellite DNA）或短串联重复（short tandem repeat，STR）。

小卫星 DNA 主要存在于染色体靠近端粒（relomere）处，核心序列为 11～60bp，在不同个体间存在串联数目的差异。如果用重复序列中没有切点、而在重复序列两侧有切点的限制性内切酶酶切，所得的酶切片段由于所包含的重复序列数目不同而出现长度的变化。以重复单位的同源序列作为特异探针进行 RFLP 分析，不同个体或不同品种的杂交图谱表现出强特异性。由于这种杂交图谱像人指纹一样有个体特异性，故称为 DNA 指纹（DNA fingerprint）。DNA 指纹技术作为一种分子标记具有以下特点：①高度特异性，同一物种两个随机个体的指纹相似系数仅为 0.22，二者指纹完全相同的概率为三千亿分之一，但 DNA 指纹图分析的灵敏度与可分辨的图带数有关；②遵循孟德尔遗传定律；③高效性，一般一个 DNA 指纹探针可产生十几条可分辨图带，而一个常规的 RRLP 探针只产生 1～2 条带，因此 DNA 指纹图能更全面地反映基因组的变异。

目前，DNA 指纹分析技术已成为研究物种的群体遗传结构、生态分布、进化关系等的有力工具。通过大量的研究工作，DNA 指纹探针也在不断地被发现。DNA 指纹探针可分为：小卫星探针、微卫星探针以及基因组总 DNA 探针。微卫星探针可探测到 DNA 中比小卫星更小的简单重复序列（微卫星），能提供更多的指纹图。

3. 染色体原位杂交

染色体原位杂交是细胞学方法和分子杂交技术相结合的产物，是指利用特异性核酸片段作探针，直接同染色体的 DNA 片段杂交，在染色体上显示特异的 DNA 或 RNA。最初是采用同位素标记探针，杂交后通过放射自显影显示杂交信

号。近几年发展出以非放射性大分子，如生物素、地高辛等标记特异性核酸片段，杂交信号经酶联显色或荧光显示的杂交技术，特别是荧光原位杂交（fluorescence in situ hybridization，FISH）技术。染色体原位杂交技术的基本步骤包括制备探针、染色体制片、染色体处理与变性、染色体与探针杂交、显微检测。染色体原位杂交的优点是准确直观，在用整个基因组 DNA 或基因组特异重复序列作探针时，可以明显区分不同物种的染色体组成，在鉴定远缘杂种染色体构型和结构变异、物种起源演化等方面有重要作用；还用来构建染色体物理图谱的低拷贝或单拷贝序列；以及用于转基因植物鉴定的含目的基因的 BAC 和 YAC 克隆。染色体原位杂交技术比较简便，结果直观。但其灵敏度和分辨率很大程度上依赖于制片技术和观察设备，一般实验室无法满足需要。

（二）基于聚合酶链反应的分子标记

20 世纪 90 年代诞生的 PCR 技术问世不久，便以其简便、快速和高效等特点迅速成为分子生物学研究的有力工具，尤其是在 DNA 分子标记技术的发展上更是起到了人们始料不及的巨大作用。

1. 随机扩增为基础的分子标记

随机扩增多态性 DNA（random amplified polymorphism DNA，RAPD）技术是以一个通常为 10bp 碱基的寡核苷酸序列为引物，对基因组 DNA 随机扩增来鉴别多态性 DNA。RAPD 标记一般表现显性遗传，若某 RAPD 片段不是重复序列，也可将其转化为 RFLP 标记。此外为提高某一理想 RAPD 标记的稳定性，可首先将其克隆并对其末端测序，然后在原来 RAPD 所用的 10bp 引物上增加合成上述末端序列的 14bp 的核苷酸，以此为引物对基因组 DNA 再进行扩增分析，即序列扩增特征区域（sequence characterized amplified regions，SCAR）标记。SCAR 的稳定性比 RAPD 增强了许多，而且待检 DNA 间的差异可直接通过有无扩增产物来显示。

与 RAPD 相似的分子标记还有任意引物 PCR（arbitary primed PCR，AP-PCR）和 DNA 扩增指纹（DNA amplification fingerprint，DAF）。AP-PCR 使用的引物较长，一般为 10～50bp；DAF 使用的引物长度比 RAPD 短，一般为 5～8bp，所提供的谱带信息比 RAPD 还多。由 RAPD、AP-PCR 和 DAF 一起组成的 DNA 多态分析方法统称为任意扩增多带谱（multiple aritrary amplification profiling，MAAP），三种类似的标记中 RAPD 使用最为广泛。

2. 以简单序列重复为基础的分子标记

微卫星 DNA（microsatellite DNA）又称简单序列重复（simple sequence repeat，SSR）或短串联重复（short tandem repeat，STR），是由几个核苷酸（2～5个）为重复单位组成的长达几十个核苷酸的重复序列，如 $(GA)_n$、$(AC)_n$、$(GAA)_n$ 等，在染色体上呈随机分布，分布密度约为 100000 个碱基对

中有一个微卫星标记。微卫星 DNA 多态性源于其核心序列的重复次数不同，重复次数越多，提供的信息量越高。

简单序列重复（simple sequence repeat，SSR）标记也可称为 SSRP（simple sequence repeat polymorphism），是根据与微卫星重复序列两端的保守序列设计一对特异引物，扩增微卫星序列本身，由于重复数目不同因而扩增出的长度变化极大，所以这是检测多态性的一种有效方法。SSR 一般检测到的是一个单一的多等位基因位点；微卫星呈共显性遗传，故可鉴别杂合子和纯合子；所需的 DNA 量少。SSR 分析技术的缺点是必须针对每个染色体座位的 SSR，测定并找到其两端的单拷贝序列设计引物，无疑这需要投入大量的人力、物力。SSR 被广泛用于资源鉴定、连锁图绘制及目标性状基因的分子标记等研究。

锚定简单序列重复（anchored simple sequence repeat，ASSR）。在 SSR 技术中采用 PCR 反应必须知道扩增 DNA 片段两侧序列，在大多数情况下某些序列本身或其旁侧序列并不清楚，这就限制了 SSR 标记的应用。ASSR 是以简单序列重复（特别是 CA）为引物来扩增产生的，锚定碱基为引物 3′端或 5′端的 2～4个碱基，扩增的 Inter-SSR 区域的多个条带通过聚丙烯酰胺凝胶电泳得以分辨，这些扩增带多为显性表现，被称为 ISSR（inter simple sequence repeat，ISSR）。在所用的两翼引物中，可以一个是 ASSR 引物，另一个是随机引物。如果一个是 5′端加锚的 ASSR 引物，另一个是随机引物，则为 RAMP（random amplified microsatellite polymorphism）技术。

3. 与 RFLP 结合的分子标记

酶切扩增多态性序列（cleaved amplified polymorphism sequence，CAP）的标记又称为 PCR-RFLP，揭示的是特异 PCR 片段限制性长度变异的信息。利用已知位点的 DNA 序列资源（包括基因数据库、基因组或 cDNA 克隆以及已克隆的 RAPD 条带）设计一套特异性的 PCR 引物（19～27bp）来扩增该位点上的某一 DNA 片段，再用一种专一性的限制性内切酶切割所得的扩增产物，凝胶电泳分离酶切片段。与 RFLP 技术一样，CAP 技术检测的多态性实际上是酶切片段大小的差异，而且是共显性分子标记，它既避免了 RFLP 分析中的杂交步骤又具有 RFLP 的精确度。

扩增片段长度多态性（amplified fragment length polymorphism，AFLP）标记是选择性扩增基因组 DNA 的双酶切片段，既有 RFLP 的可靠性又有 RAPD 的灵敏性。AFLP 基本原理是将基因组 DNA 进行限制性内切酶酶切，然后选择特定的片段进行 PCR 扩增，使用双链人工“接头”与基因组 DNA 的酶切片段相连接作为扩增反应的模板，“接头”与“接头”相邻的酶切片段的几个碱基序列作为引物的结合位点。引物由三部分组成：与人工接头互补的核心碱基序列；限制性内切酶识别序列；引物 3′端选择碱基序列（1～10bp）。只有那些两端序

列能与选择碱基配对的限制性内切酶片段被扩增。该标记系统通过少量的引物扩增产生了数量丰富的带型标记，并且分辨率高，是一种十分理想和有效的遗传标记。

（三）基于 DNA 芯片技术的分子标记

同一位点的不同等位基因之间常常只有一个或几个核苷酸的差异，单核苷酸多态性（single nucleotide polymorphism，SNP）可以帮助区分两个个体遗传物质的差异。SNP 标记物的产生要求在群体中有很高的出现频率。在筛选 SNP 标记时如果以 SNP 标记在被筛选对象的群体中出现频率为 10%计算，则至少在 10 个被筛选对象中有一个单核苷酸多态性标记才被认为是 SNP 标记。以这样的出现频率在筛选 SNP 时必须对 10 个个体的全基因组进行精确度达到 0.01%的直接测序。SNP 在整个人类基因组中分布密集，人类基因组中每 1000bp SNP 出现一次，被认为是应用前景最好的遗传标记物，可作为基因特异性标记的 SNP 又被称为第三代多态性标记。检测 SNP 的最佳方法是 DNA 芯片技术。SNP 的研究将帮助人们寻找新的遗传病的病因基因，认识人种、人群、个体间的遗传差异，疾病与个体差异的关系，以及个体差异对药物的耐药性存在的不同的反应能力等。

常用的分子标记特性比较见表 7-1。

表 7-1 常用的分子标记特性比较

特性	RFLP	RAPD	AFLP	SSR
分布	普遍	普遍	普遍	普遍
可靠性	高	中等	高	高
重复性	高	中等	高	高
遗传性	共显性	显性	显性或共显性	共显性
多态性	中等	高	非常高	高
DNA 需求	2～30ng	1～100ng	100ng	50～100ng
放射性	一般有	无	有/无	无
技术难度	中等	简单	中等	简单
样品生产率	中低	高	非常高	高
时间因素	长	快	中等	快
探针类型	低拷贝 DNA 或 cDNA 克隆	随机序列	特异 DNA 序列	特异 DNA 重复序列
探测部分	低拷贝编码区域	整个基因组	整个基因组	整个基因组
检测位点	1～3	1～10	20～100	1～5

第二节 DNA 分子标记鉴定的常用方法

一、DNA 序列测定法

（一）基本理论

DNA 序列测定法是通过克隆或 PCR 法扩增目的 DNA 序列片段，然后用化

学法、酶法测定 DNA 碱基序列。经典 DNA 序列分析是以分子克隆为基础的，所需时间长、工作量大、成本高，很难应用于大量基因或分类群的研究中。此外，由于克隆的为单个分子，不适合于杂合位点的基因研究。基于 PCR 技术的 DNA 直接测序法是以双链或单链 DNA 为模板，以 PCR 扩增引物作为测序引物，采用全自动 DNA 序列测序仪进行。与分子克隆测序法相比所需时间短、效率高，无论是杂合的等位基因或是重复序列的重复单位存在序列上的差异，序列图谱均能得到反映。

选择一段 DNA 序列进行 DNA 分子标记鉴定时，应注意以下几点。

① 序列应有足够长度，可提供足够数量的带有系统发育信息的核苷酸位置。比较类群间的序列趋异率在 5%～15%之间，通常表明是一个合适的趋异率，这时既可使性状间的多次置换（multiple hits）降至最小，又能提供足够数量的性状。

② 序列必须容易排序（alignment）。序列排序对于正确评价性状同源性是必需的，在上述变异范围内的编码序列通常是易于排列的。

③ 序列必须是种源的（orthologous）。许多核基因是区分种源（与生物体系统发育有关的同源基因）和基原（基因组内和基因重复有关的基因）的，而叶绿体基因组内的所有基因由于为单拷贝，不存在区别种源和基原问题。

（二）常用的 DNA 序列

1. 核基因组

（1）rDNA 重复区　rDNA 即核糖体 DNA（ribosomal DNA，rDNA）。它是以重复连续排列方式存在，在每一个基因组中的拷贝数在 500～40000 之间，其长度约为 10kb。rDNA 包含编码区、非编码转录区和非转录区，编码区编码 18S rRNA、5.8S rRNA 和 25S～28S rRNA，这三个单位被两个非编码转录区（ITS_1 和 ITS_2）隔开，另外还有一段非转录区（IGS）。这三个区域的 DNA 突变率按编码区、非编码区和非转录区依次增大，因为 rRNA 是细胞代谢活动中必不可少的成分，它的变异直接影响到细胞的生存。因此 rRNA 的编码区选择压力大，其保守性也很大；非编码转录区（ITS）虽不直接编码 rRNA，但其中一些序列保守性也较强，它们可能与成熟的 rRNA 的加工有关，此区的保守性介于编码区和非转录区之间；而非转录区的选择压力小，其变异程度最大。因此编码区序列一般用于高级阶元的系统发育研究，而非编码区序列常用于较低分类阶元的系统学研究。

① ITS 序列　rDNA 的内转录间隔区（internal transcribed spacer，ITS）包含被 5.8S rDNA 所分割的 ITS_1 和 ITS_2 两个片段。在被子植物中 ITS_1 的长度为 187～298bp，ITS_2 为 187～252bp。

ITS 序列变异较快，能提供丰富的遗传信息，已证实它是研究许多被子植物

类群系统与进化的重要分子标记。关系密切的物种间ITS长度接近，但序列有一定程度的变异，因此该片段特别适合于属、组级的系统发育和分类研究。由于同步进化的原因，ITS在许多物种内不存在变异，因而一般不适合种内分类水平上研究。

② 18S rRNA　18S rRNA基因是编码组成真核生物核糖体小亚基（40S）的rRNA的DNA序列，其长度为1850bp。18S序列对于被子植物内高级分类水平上（科以及科以上）的系统发育研究可提供较多的信息，其序列变异程度尤其适用于探讨被子植物乃至种子植物内部的深度系统发育分支间的关系。同时由于不同类群间序列的变异程度有所差异，18S有时也用于亚科或属间关系的重建。

（2）5S rRNA　5S rRNA基因是真核生物中另一类高度保守的串联重复序列，与rDNA在染色体上彼此独立分布，重复单位为200～900bp，单倍体基因组的拷贝数1000～50000。5S rRNA由编码区和间隔区组成，编码区120bp，是该基因的保守区。间隔区的长度和序列物种间变化很大。

2. 叶绿体基因组

高等植物细胞器基因包括叶绿体基因组（cpDNA）和线粒体基因组（mtDNA）。由于植物线粒体基因组重排事件频繁，而植物的叶绿体基因组相对比较保守而多用于分子系统学研究。

被子植物中cpDNA的大小、结构和基因组成是相当一致的，为闭环双链DNA，约占植物总DNA的10%～20%，长度一般为120～220bp。植物的叶绿体基因组具有下列特性：① 基因组小，但包含大量的DNA成分；② 在分子水平上差异明显，为比较进化研究提供了基本的信息支持；③ 编码区和非编码区序列进化速率相差较大，适于不同分类阶元的系统发育研究。cpDNA中有20个基因足够大（＞1kb），并日渐广泛地用于序列比较研究，常用的有*rbcL*、*matK*、*ndh*、*trn*内含子等。

（1）编码基因

① *rbcL*基因　1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/氧化酶大亚基（ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit，rbcL）基因位于植物的cpDNA的大单拷贝区，长约1400bp。由于1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/氧化酶在光合作用中所起的关键作用，*rbcL*基因总体来说是相对保守的；在不同的植物类群中的进化速率有较大的差异；*rbcL*基因分辨率高，变异较均一分布，一般用于属以上的分类群研究。

② *matK*基因　*matK*基因位于赖氨酸tRNA（*trnK*）基因的内含子中，为单一拷贝的编码基因，长约1550bp，编码一种参与RNA转录体中Ⅱ型内含子的剪切的成熟酶。*matK*基因是到目前为止被认为在叶绿体基因组中所有编码蛋白基因中进化速率最快的基因之一，进化速率约是*rbcL*的2～3倍，ITS序列的一

半左右，可用于科内、属间、甚至种间关系的研究。由于 *matK* 序列的变异较为均一，在构建系统树时不必对不同类型的变异进行加权，极大地增强了分子系统树的可靠性。

③ *trn* 基因 tRNA 基因（*trn*）编码叶绿体自身蛋白质合成所用到的 20～40 种 tRNA，该基因内包括三段非编码区，由于不受功能的限制其进化速率大于功能编码区，目前已被广泛用于植物系统学研究。在科下水平的系统学研究中，*trnL-trnF* 的使用频率较高。

④ *ndh* 基因 迄今为止在叶绿体中共发现了 11 种与线粒体 NADH 脱氢酶同源的 DNA 序列，分别命名为 *ndhA*、*ndhB*、*ndhC*……*ndhK*。研究认为它们可能编码叶绿体中的 NAD（P）H 脱氢酶，并参与叶绿体的呼吸过程。常用于系统学研究的是 *ndhF* 基因。由于 *ndhF* 基因进化速率也比较快，所以常用于属间以上的系统学研究。

⑤ *atp* 基因 *atp* 基因位于叶绿体基因组的大单拷贝区，编码 ATP 合成酶，分别有 *atpA*、*atpβ*、*atpD*、*atpF*、*atpH*、*atpI* 编码 α、β、δ、Ⅰ、Ⅲ亚基和 70kD 的疏水蛋白。*atpβ* 基因两边毗邻的 *atpE* 和 *atpL* 基因，长度为 1497bp，此基因较为保守。进化速率与 *rbcL* 相似，在较高分类阶元的比较序列研究中具有一定的价值。

（2）非编码区序列

① cpDNA 内含子

a. *rpL 16* 内含子。叶绿体中编码核糖体蛋白 L16 的 *rpL 16* 基因位于 cpDNA大单拷贝区，由两个外显子和中间一段相对较长的Ⅱ型内含子组成，其中内含子序列的差异主要体现在长度上。作为 cpDNA 中进化最快的内含子之一，*rpL 16* 内含子在远缘类群间的长度变异非常明显，使得较为确定的排序几乎是不可能的，因此 *rpL 16* 内含子一般用于较低分类阶元或近缘类群间的系统发育研究，但其所能提供的系统学信息明显低于 rDNA 的 ITS 序列。

b. *rpS 16* 内含子。编码核糖体蛋白 S16 的 *rpS 16* 基因位于植物 cpDNA 大单拷贝区，但在某些科的代表种中部分或完全缺失，如杜仲科（Eucommiaceae）、壳斗科（Fagaceae）、亚麻科（Linaceae）及杨柳科（Salicaceae）等。该基因被一个Ⅱ型内含子分割为两部分，内含子的长度从 707～951bp 变化不等。*rpS 16* 内含子一般适用于较高分类阶元的系统发育研究。

② cpDNA 基因间区 叶绿体基因间区部分不参加转录翻译过程，因而在功能上限制较少，变异较为自由，比编码基因能提供更多的系统发育信息。目前用于系统学研究的叶绿体基因间区如下。

atpB-rbcL 基因：一般长约 900bp，多用于科间、族间或属间。

trnC-rpOB：长约 1200bp，用于种及种下系统。

psbA-trnH：长约 300bp，用于组间及种间的发育研究。

accD-rbcL：长度及结构变异较大，在低分类阶元的系统发育分析中有一定的应用价值。

a. *trnL-trnF* 非编码区。编码转运 RNA 的 *trnL* 基因位于 cpDNA 的大单拷贝区，中间被一长约 390～615bp 的内含子分隔为两部分，一般认为此片段的序列较短，提供的信息性状较少，且在结构上与 *trnF* 基因相邻，故这两个非编码区序列场结合在一起被测定分析。其进化速率与 ITS 序列相比，ITS 的替代速率平均是整个 *trnL-trnF* 非编码区的 2～3 倍。

b. *trnT-trnL* 间区。编码转运 RNA 的 *trnT* 和 *trnL* 基因间有一段较长的基因间区，一般在 600～1400bp 之间，属 cpDNA 中进化速率较快的非编码区序列。

3. 线粒体基因组

已知线粒体基因组至少包括 tRNA、rRNA、细胞色素氧化酶、细胞色素还原酶（b 复合物、c 复合物）、ATP 酶以及一些耐药性基因。mtDNA 的相对分子质量在 1×10^6～200×10^6，动物的 mtDNA 比较小，为 10×10^6；植物的为 70×10^6～200×10^6。植物 mtDNA 与动物 mtDNA 有很大的差异，动物的 mtDNA 进化比相应的核 DNA 快 5 倍，而植物的 mtDNA 的进化比叶绿体和核 DNA 都慢，约为核 DNA 的 1/5。而且植物 mtDNA 经常发生序列重排，基因组比动物大，变化范围大。因此植物的 mtDNA 序列分析受到限制。动物线粒体 DNA 的 12S rRNA 和细胞色素 b（*cyt-b*）基因常用于鉴定研究中。

二、随机扩增多态性 DNA（RAPD）分析

RAPD 分析是由美国生物学家 Williams（1990）和 Welsh（1990）领导的两个研究小组同时提出的。以 PCR 为基础，由一系列人工合成的碱基顺序随机排列的寡核苷酸单链（一般为 10bp）作引物，以基因组 DNA 为模板进行扩增。如果引物与某一片段的模板具有互补的核苷酸序列，该引物就会结合到单链的 DNA 上去，通过 DNA 聚合酶从引物的 3′-OH 端开始合成一段新的互补的 DNA 链。在整个基因组中某一引物可能会与单链的 DNA 的许多地方结合，但只有在约 2000bp 以内存在着反向平行的与某一引物互补的双链 DNA 分子时，才能通过该引物合成 1 条与该序列互补的新链。扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳分离和溴化乙锭（EB）染色后，可在紫外灯下检测到扩增出的分子量大小不等的 DNA 片段所形成的多态性带谱，这些扩增片段的多态性反映了基因组 DNA 相应区域的多态性。对于任一特定的引物，它与基因组 DNA 序列有特定的结合位点，如果基因组在这些区域发生 DNA 片段插入、缺失、突变就可能导致这些特定结合位点分布发生相应的变化，从而导致扩增产物长度变化或产物的出现或消失，表现

为有或无某特定的扩增带，提供不同个体间 DNA 多态性分析的依据，因此通过对 PCR 产生的检测就可测出基因组 DNA 在这些区域的多态性。

RAPD 技术是较早应用于中药鉴别的分子标记之一。RAPD 的优点是简单易行，需要的 DNA 量极少（15～25ng），无放射性，试验设备简单，周期短。缺点是多数位点的标记表现为显性，不能提供完整的遗传信息，稳定性差。

通过 RAPD 技术对真伪药材 DNA 的多态性分析，找出真品特定的 DNA 片段，可对此测序并制备 DNA 探针来检测相应的药材。RAPD 技术尤其适用于贵重药材的鉴定，如鉴别不同种的人参及其伪品。RAPD 技术与 RFLP 技术常被结合起来鉴定中药，如鉴别箭叶淫羊藿、甘草属药材等。

三、任意引物 PCR（AP-PCR）技术

在 AP-PCR 分析中，扩增分为三个部分，每个部分要求的条件和组分的浓度存在差异。在第一个 PCR 循环中，引物浓度较高，引物长度不定，并且常来自为其他目的而设计的引物（如 M13 通用测序引物）。

四、限制性片段长度多态性（RFLP）分析

RFLP 是 Grodzicker 于 1974 年创立的。真核生物基因组 DNA 经适当的限制性内切酶降解后，得到的许多大小不等的片段，凝胶电泳后由于他们的迁移率不同形成不同的带，通过与克隆的 DNA 探针进行 Southern 杂交和放射自显影后，即产生和获得反映生物个体特异性的 RFLP 图谱，由于 RFLP 起源于基因组 DNA 自身的变异和 DNA 分子中表现 RFLP 的位点多为单一序列，实验时常选用同源探针，即被检测物中的随机克隆的单拷贝或低拷贝基因组 DNA 或 cDNA片段，这样可高效检测出生物间遗传差异的大量多态性，进而成为有效的 DNA 分析手段。用作 RFLP 的探针有 cDNA（即互补 DNA，用 RNA 作模板通过反转录合成的 DNA）与基因组 DNA 两种。

将药材 DNA 用限制性内切酶消化后，进行限制性片段长度多态性分析，确定其基因的种属特异性，如 3 种苍术的鉴别、5 种羽扇豆属药用植物的鉴别。亦要对药材 DNA 的 PCR 扩增产物进行限制性片段长度多态性分析，找出种属特异性来鉴别中药。

五、扩增片段长度多态性（AFLP）技术

AFLP 是 1993 年由荷兰 Zabeau 和 Vos 博士发明的一项技术。在检测 AFLP 时，先用内切酶酶解基因组 DNA，再将接头连接到限制性片段的两端，然后用专用的引物扩增连接后的限制性片段的混合物，扩增结果通过电泳显示。具体实验过程中，为了使酶切片段大小分布均匀，一般采用两个限制性内切酶，一个酶

为多切点，另一个酶的切点数较少，因而，AFLP 反应过程中产生的主要是两个酶共同酶切的片段。此外，设计的专用引物除了核心碱基序列和限制性内切酶识别序列外，引物的 3′端还延伸出 1～10 个数量不等的随机核苷酸碱基，通过选用不同数量的这种碱基可以调节 AFLP 产物的条带特异性和数量，从而提供较多的基因组多态性信息。

AFLP 兼有 RFLP 和 RAPD 的优点，多态性强，具有较高的可靠性和重复性，操作简便，速度快，DNA 用量少。因此，AFLP 被认为是迄今为止的最有效的分子标记，非常适合绘制品种的指纹图谱及进行分类研究。缺点是对模板反应迟钝，成本高，对技术要求苛刻。

六、SCAR 技术

SCAR 标记是在 RAPD 技术的基础上发展起来的。其基本步骤是：先做 RAPD 分析，然后把目标 RAPD 片段（如与某目的基因连锁的 RAPD 片段）进行克隆和测序，根据原 RAPD 片段两末端的序列设计特定引物（一般比 RAPD 引物长，通常 24 个碱基），再进行 PCR 扩增，这样就可把与原 RAPD 片段相对应的单一位点鉴定出来。这样的位点就称为 SCAR。SCAR 比 RAPD 和其他利用随机引物的方法在基因定位和作图中的应用更好，因为它有更高的可重复性（原因是使用的引物长），标记是共显性遗传的。

第三节　中药 DNA 和 RNA 制备的基本方法

中药基原绝大多数是真核生物，所以主要介绍真核生物 DNA 和 RNA 的制备。一般来说，提取 DNA 没有固定的方法。但是提取 DNA 时应先将样品的细胞破碎，然后去除蛋白质和多糖等。细胞器中线粒体和叶绿体 DNA 的提取，一般先提纯细胞器，再溶解细胞器膜，待释放出细胞器 DNA 后，再进一步提取和纯化。

一、核细胞染色体 DNA 的制备

（一）基本理论

由于真核生物细胞中存在着核、线粒体，绿色植物细胞中还有叶绿体，因此 DNA 的纯化过程相当复杂。真核生物中的一切有核细胞（包括培养细胞）都可以用来制备 DNA，而且真核细胞的染色体 DNA 均为大分子量 DNA，在提取操作时，只有把机械剪切力的作用控制在最小程度，才能获得尽可能大的 DNA 分子。

制备 DNA 的样品破碎有多种方法，如超声波法、匀浆法、液氮破碎法、氧

化铝粉（或石英砂）研磨法，但这些物理性的操作均可导致 DNA 链的断裂。

为了获得大分子量的 DNA，常采用酚-氯仿抽提法，即在 EDTA 和 SDS 存在下，用蛋白酶 K 消化细胞，然后用酚-氯仿抽提法去除蛋白质，透析出去低分子量杂质。这种方法可得到 100～200kb 的 DNA，能够用于 Southern 杂交分析，以构建基因组 DNA 文库。

（二）样品处理的方法

1. 生物组织的处理

对生物组织进行大分子 DNA 分离时，最好用新鲜组织。若不能马上进行 DNA 提取，可将样品储藏于液氮或－70℃冰箱中。不同的生物体，以及同一生物体的不同组织细胞，其核酸与蛋白质的含量和分布情况不一，选材时应参阅有关资料（表 7-2）。

表 7-2　用于 DNA 和 RNA 制备的材料一般处理方法

材料		处理方法
植物组织	肉质的组织	乳钵研磨
	多纤维组织	加砂或液氮研磨；高速捣碎器处理
动物组织	较柔软组织	匀浆器研磨
	较韧性组织	先绞碎，再匀浆；或液氮研磨

液氮操作应戴手套和防护目镜，以防溅出的液氮冻伤皮肤。动物组织样品提取废弃物应视为有害生物材料，须经灭菌措施处理。

2. 培养细胞

悬浮培养细胞可直接经 4℃，收集细胞离心 10min（1500r/min）。对于贴壁培养细胞，用胰酶适当消化后再离心收集，细胞数应在 5×10^7 左右。用预冷的 PBS 液洗细胞 2 次，弃上清液收集细胞。

3. 血液样品

将 20mL 新鲜血液与 3.5mL ACD 抗凝液（柠檬酸 0.48g，柠檬酸钠 1.32g，右旋葡萄糖 1.47g，加水至 100mL。使用时，每 6mL 新鲜血液加 1mL ACD 抗凝液）混匀，0℃下可保存数天或－7℃下长期冻存备用。分离抗凝血中的白细胞，用生理盐水或 PBS 洗涤 1 次。

（三）DNA 的提取

取处理后的材料，用 DNA 提取液悬浮细胞，用酚-氯仿抽提法去除蛋白质等，提取染色体 DNA。操作方法如下：

1. 试剂

DNA 提取缓冲液［100μg/mL 蛋白酶 K，10mmol/L Tris-HCl（pH8.0），15mmol/L NaCl，10mmol/L EDTA（pH8.0），0.4％SDS］，0.01mol/L PBS

(pH7.2)，TE缓冲液pH8.0（10mmol/L Tirs-HCl，1mmol/L EDTA）。

2. 操作步骤

离心10min（1500r/min），收集1×10^7培养细胞；用1～10mL PBS重悬细胞，洗涤1～2次；加DNA提取缓冲液约0.4mL，重悬细胞，37℃保温12～24h；用等体积的酚-氯仿-异戊醇（25∶24∶1）抽提样品，离心10min（5000r/min），转移上层水相，重复抽提1～2次；将上层水相移入1个新离心管中，加入1/10体积的3mol/L乙酸钠（pH5.2）和2.5倍体积无水乙醇，混匀；置－20℃沉淀DNA 60min左右后，离心15min（10000r/min）；以70%乙醇洗涤DNA沉淀1～2次，风干或真空抽干；沉淀溶于100μL TE缓冲液（pH8.0）中，－20℃保存。

操作中注意事项：①饱和酚的pH值应接近8.0，所配其他试剂pH值要准确；蛋白酶K在正式使用前应做预试验，确定其活性的大小，否则影响实验结果；②所得DNA沉淀不宜完全干燥，否则难以溶解；③所得核酸应进行电泳检查或定量检测。

3. DNA提取的相关问题说明

① 细胞内常存在活性很高的DNA酶，为了避免钝化DNA酶的作用，溶液中常加入EDTA、SDS以及蛋白酶等。EDTA具有螯合Ca^{2+}和Mg^{2+}的作用，而Ca^{2+}和Mg^{2+}是DNA酶的辅助因子。一般DNA抽提液中的EDTA浓度为0.1mol/L，可有效抑制DNA酶且水相易与酚相分层。SDS和蛋白酶K则分别具有使DNA酶变性和降解的作用。

② 制备的DNA样品中也会有RNA杂质，但RNA极易降解，而且，少量的RNA对DNA的操作无大影响，必要时可加入无DNA酶的RNA酶以去除RNA的污染。

③ 虽然DNA的提取方法很多，并已成功地应用到许多真核生物，但是从植物细胞中分离DNA始终是一个值得探讨的问题。由于多数植物细胞存在着坚硬的细胞壁，这给细胞的温和裂解带来严重阻碍。迄今为止还未设计出提取植物DNA普遍适用的方案，但已具备许多可应用的提取程序。

二、RNA的制备

从细胞中分离RNA的纯度与完整性对于许多分子生物学实验非常重要。如cDNA合成及体外翻译、Northern印迹及杂交分析等实验的成败，在很大程度上取决于RNA的质量。RNA的制备与分析对于了解基因表达在转录水平上的调节也是必不可缺的。通常一个典型的哺乳动物细胞约含10^{-5}μg RNA，其中只有1%～5%为mRNA。绝大多数mRNA分子为3′-poly（A）RNA，利用此特征，可很方便地从总RNA中用寡聚（dT）亲和色谱分离mRNA。

植物细胞 RNA 的合成有其独特之处，叶绿体和线粒体中都分别带有一套独立的转录及翻译体系，因为它们合成 RNA 所用的 RNA 聚合酶都不同，合成的 RNA 也各不相同，如叶绿体中的 rRNA 分别为 23S、16S、5S 和 4.5S，而线粒体中的 rRNA 分别为 24S、18S 和 5S。

理论上，每克细胞可分离出 5～10mg 总 RNA，对于培养细胞而言，1g 细胞相当 1mL 压积的细胞，大约 10^8 个细胞左右。

（一）RNA 提取的基本原则

RNA 的分离纯化的最关键因素是尽量减少 RNA 酶（RNase）的污染。RNA 酶，尤其是胰 RNA 酶是一类生物活性非常稳定的酶类。除细胞内 RNase 以外，环境中灰尘、各种实验器皿和试剂、人体的汗液以及唾液中均存在 RNase。这类酶耐热、耐酸、耐碱，煮沸也不能使之完全失活，蛋白质变性剂可使之暂时失活，但变性剂去除后，又可恢复活性。RNase 的活性不需要辅助因子，二价金属离子螯合剂对它的活性无任何影响。故在提取 RNA 时，应尽力创造一个无 RNA 酶的环境。这主要包括两方面，即尽力避免外源性 RNA 酶的污染和尽力抑制内源性 RNA 酶的活力。前者主要来源于操作者的手、实验的器皿和试剂；后者主要来源于样品中的组织细胞。

1. 避免外源性 RNA 酶的污染

① 在整个操作过程中，应戴口罩和手套；在比较洁净的环境中进行。② 玻璃器皿常规洗净后，应用 0.1%焦碳酸二乙酯（DEPC）浸泡处理（37℃，2h），再用双蒸灭菌水漂洗几次。③ 高压消毒去除 DEPC，然后 250℃烘烤 4h 以上或 200℃干烤过夜。塑料器材最好使用灭菌的一次性塑料用品，离心管、微量加样吸头最好是新的，在使用前进行高压消毒。④ 所有溶液应加 DEPC 至 0.05%～0.1%，室温处理过夜，或室温下磁力搅拌 20min，然后高压灭菌除去残留的 DEPC。不能高压灭菌的试剂，用经 DEPC 处理过的无菌蒸馏水配制，然后用滤膜过滤除菌。DEPC 易与 Tris 反应，DEPC 在 Tris 中的半衰期只有 1.25min，所以配制 Tris 溶液的水应先用 0.1%DEPC 处理然后高压消毒，配好后再进行高压消毒。⑤ RNA 提取所使用的酚，应该单独配制和使用，在配制饱和酚用的缓冲液时，使用的水应预先用 DEPC 处理并高压消毒，酚饱和后，加入 8-羟基喹啉至 0.1%，不但抗氧化，且有一定的 RNA 酶抑制作用。⑥ 实验中使用的甲酰胺，应用 5% 50g/L 的 AG501-X8（D）树脂彻底去离子，Whatman 1 号滤纸过滤后，然后以 0.45μm 的滤膜过滤除菌。⑦ 所用的化学试剂应为新包装，称量时使用干烤处理的称量勺，CsCl 晶体最好先经紫外线消毒，200℃干烤 6～12h。所有操作均应在冰浴中进行，低温条件可减低 RNA 酶的活性。⑧ 焦碳酸二乙酯（DEPC）为黏性液体，是很强的核酸酶抑制剂，作用机制是通过与蛋白质中的组氨酸结合，使蛋白质变性。DEPC 不能用聚苯乙烯器皿存放。保存在 4℃或更低温

度中，可防止 DEPC 降解。DEPC 与 0.1～1mg/mL 的肝素联合使用，具有极强的 RNA 酶抑制效果。DEPC 在 Tris 中易分解成为 CO_2 和乙醇，使 pH 值下降。

2. 抑制内源性 RNA 酶的活性

在细胞裂解的同时，RNA 酶释放出来，这种内源性的 RNA 酶是降解 RNA 的主要危险因素之一。所以原则上要尽可能早地去除细胞内蛋白，加入 RNA 酶抑制剂，力争在提取的起始阶段对 RNA 酶活力进行有效的抑制。不同组织细胞中内源性 RNA 酶的数量和活性不同，胰腺、脾组织细胞中 RNA 酶的含量极为丰富，在 RNA 提取时需要联合使用强有力的 RNA 酶抑制剂。

在实验中经常使用的 RNA 酶抑制剂主要有以下几种。

① DEPC 和肝素。

② 肌类解偶剂——异硫氰酸胍，目前认为是最有效的 RNA 酶抑制剂，它在裂解组织的同时也使 RNA 酶失活。异硫氰酸胍和盐酸胍是一类强力的蛋白质变性剂，可溶解蛋白质，并使蛋白质二级结构消失，细胞结构降解，核蛋白迅速与核酸分离，所以又称解偶剂。利用它们可从胰腺这种富含 RNA 酶的组织细胞中分离出完整的 RNA 分子，故目前这类物质成为制备 RNA 的常规试剂。

③ RNA 酶的特异抑制剂，主要包括 RNA 酶阻抑蛋白（RNasin）和氧钒核糖核苷复合物两种物质。

RNA 酶阻抑蛋白（RNasin）是一类从大鼠肝或人胎盘中提取出来的酸性糖蛋白，可与 RNA 酶结合，从而抑制其活性。RNasin 最好不要与某些蛋白质变性剂（如尿素）同时使用，因为尿素能使 RNasin-RNase 复合物分离，并释放出活性的 RNase。RNasin 对其他核酸工具酶无影响，然而对 RNA 酶有强的特异性抑制效果，很容易被酚抽提除去，故应用日益广泛。不过，该制品反复冻融或储存于有氧化剂的溶液中极易被破坏，不宜继续使用。

氧钒核糖核苷复合物是由氧化钒离子和核苷形成的复合物，它和 RNA 酶结合后，几乎可完全抑制 RNA 酶的活性。在 RNA 制备中，使用浓度一般为 10mmol/L，提取的 mRNA 产量很高，其质量可满足反转录实验的要求。可用酚反复抽提以去除之。

其他如酚-氯仿、去污剂（如 SDS）、蛋白酶 K、尿素、硅藻土等对 RNA 酶也有一定的抑制作用。

（二）RNA 的提取

提取 mRNA 一般有两条途径。其一是先提取多聚核糖体，再将蛋白质与 mRNA 分开。利用抗原抗体的反应，可将含量极微的、特异的 mRNA 提取出来，因为没有合成完的蛋白质还停留在多聚核糖体上。这些新生肽链能与完整蛋白质的抗体发生抗原抗体反应，因此可选择性沉淀特异的 mRNA。其二是提取细胞总 RNA，利用寡聚纤维素柱色谱，把 mRNA 与其他的 RNA 分开。因为几

乎所有的 mRNA 的 3′端都具有 poly(A) 的序列，而其他 RNA 却没有这样的结构。进行纤维素柱色谱时，只有 3′端有 poly (A) 的 mRNA 才结合在柱上，从而达到与其他 RNA 分离的目的。

现将提取培养细胞总 RNA 的常规方法简介如下。该法制备的 RNA，操作得当，应无 DNA 和蛋白污染，可直接用于 Northern 印迹分析、cDNA 合成和体外转录。

1. 材料和仪器

1× PBS 缓冲液 (pH7.4)；变性液 (pH6.8) (4mol/L 异硫氰酸胍，26mmol/L 柠檬酸钠，0.5% 十二烷基肌氨酸钠，0.125mol/L β-巯基乙醇)；2mol/L NaAc (pH4.0)；酚-氯仿-异戊醇 (25∶24∶1)；异丙醇；75%乙醇。

1.5～2mL 聚丙烯离心管，高速混匀器，高速冷冻离心机，无 RNase 纯水。

2. 操作步骤

① 离心收集 1×10^7 细胞，用预冷的 PBS 洗涤 1～2 次，弃上清液；加入预冷的变性液 600μL 悬浮细胞，高速涡旋 15～30s (或高速匀浆 15～30s)。

② 加入 2mol/L NaAc 60μL，颠倒离心管 4～5 次，使溶液混匀；加入 600μL 酚-氯仿-异戊醇，小心颠倒离心管 3～5 次，混匀，强力振荡 10s 后，冰浴 15min；4℃，离心 20min (10000r/min)，小心地将上层水相移入 1 个干净的离心管中 (不能吸到中间层)。

③ 加入等体积异丙醇，置 −20℃ 沉淀 RNA30min；4℃，离心 15min (10000r/min)；弃上清液，再加变性液 2mL 重悬 RNA 沉淀物；加等体积异丙醇，−20℃沉淀 RNA30min；4℃，离心 15min (10000r/min)。

④ 弃上清液，用冰冷的 75%乙醇 1～2mL 洗沉淀 1～2 次；在无菌超净台上风干沉淀 5～20min；将 RNA 溶于 50～100μL 无 RNase 纯水中，−20℃保存。

3. 注意事项

① 所有操作注意在无 RNase 的环境中进行；RNA 沉淀不宜完全干燥，否则沉淀难以溶解；纯 RNA 样品的 A_{260}/A_{280} 值为 1.7～2.0，若低于该值，表明存在蛋白质污染，可重新用酚-氯仿抽提。②RNA 完整性的检测可通过琼脂糖凝胶电泳。28S 和 18S 真核细胞 RNA 比值约为 2∶1，表明无 RNA 降解。如该比值逆转，则表明有 RNA 降解。

第四节　植物药 DNA 的制备

一、材料的预处理

供提取 DNA 用的植物材料可为新鲜叶片或根、用变色硅胶保存的干叶片或

根、市售中药材干品。为防止外源 DNA 的污染，每个样品均经去离子水清洗、纯水清洗、紫外线照射 30min 等处理过程。

二、试剂与仪器

1. 试剂

Tris，β-巯基乙醇，SDS，PVP（聚乙烯吡咯烷酮），CTAB（十六烷基三甲基溴化铵），琼脂糖，溴化乙锭（EB），RNase，玻璃砂（自制）。

缓冲液 A：50mmol/L Tris-HCl（pH8.0），10mmol/L EDTA，5mmol/L β-巯基乙醇，2%SDS。

缓冲液 B（pH5.5）：100mmol/L 醋酸钠，50mmol/L EDTA，500mmol/L 氯化钠，2.5%PVP，3%SDS，1%β-巯基乙醇。

缓冲液 C：50mmol/L Tris-HCl（pH8.0），10mmol/L EDTA，0.7mol/L NaCl，1%β-巯基乙醇，1%CTAB。

缓冲液 D：10%CTAB，0.7mol/L NaCl。

缓冲液 E（pH8.0）：10mmol/L Tris-HCl，1mmol/L EDTA（即 TE 溶液）。

氯仿-异戊醇（24∶1），临时配制。异丙醇－20℃预冷。70%乙醇。

2. 主要仪器

低温高速离心机，分光光度计，凝胶成像仪，低温恒温式电泳仪，纯水器，恒温水浴箱，冰箱，各种规格的微量加样器等。

三、原理和方法

从植物中提取基因组 DNA 的方案众多，其中较为常用的方法有苯酚法、CTAB 法和高盐低 pH 值介质提取法三类。

1. 苯酚法

苯酚法是 DNA 的提取中应用较为广泛的方法，该法对新鲜样品的提取效果比较好，但操作比较繁琐费时，对市售中药提取效果较差。基本方法为：① 称取 0.3g 样品，用玻璃砂（也可用适量液氮或氧化铝）研磨粉碎，将粉末转入 10mL 离心管中，加入 5mL 缓冲液 A，混匀，37℃放置过夜；② 10℃离心 10min（10000r/min），取上清液添加等体积的水饱和酚溶液（pH8.0），反复混匀，室温下作用 30min，4℃离心 20min（10000r/min），收获上层水相，先用酚-氯仿-异戊醇（25∶24∶1），再用氯仿-异戊醇（24∶1）抽提各 1 次直至无白色中间层；③ 将上清液移入另一干净离心管，加入等体积异丙醇混匀，放入－20℃冰箱，45min 后离心 25min（12000r/min），得到的沉淀用 70%乙醇洗 2 次，将沉淀溶于 150μL 缓冲液 E，存于 4℃备用。

2. CTAB 法

CTAB是一种阳离子去污剂，既能裂解植物细胞又能有效沉淀多糖，因此有其独到的优点，但对有些植物，特别是裸子植物，用CTAB法是失败的。该法虽适用于许多新鲜植物材料的DNA提取，但对干品中药的DNA提取纯度不高。其基本方法为：① 称取0.3g样品，用玻璃砂（也可用适量液氮或氧化铝）研磨，加入56℃10倍预热的缓冲液C，于56℃温育30min，离心（10000r/min），取上清液加入等体积氯仿-异戊醇（24：1）抽提，室温（不能低于15℃，否则CTAB会沉淀）离心15min（10000r/min）；②取上清液加入1/10倍体积缓冲液D，于室温下放置15min，再用等体积氯仿-异戊醇(24：1)抽提2次，上清液加入缓冲液C，于室温下放置6h或过夜，离心25min（12000r/min），吸去上清液，用70%乙醇洗沉淀2次，加入150μL缓冲液E，储于4℃备用。

3. 高盐低pH值介质提取法

此方法的关键是用了1个低pH值的提取介质，它能有效防止组织破碎和沉淀大量材料时的电离化作用及酚化合物的进一步氧化，所得DNA纯度好，产率高，无须进一步纯化，可直接用于限制性片段长度多态性（RFLP）及随机扩增多态性DNA（RAPD）等分子水平的遗传标记。用低pH值介质、高盐沉淀蛋白的方法，从新鲜或干燥中药中提取总DNA，其效果都比较好。其基本方法为：①取样品（鲜品1g、干品0.3g）放入无菌研钵中，加入等体积玻璃砂（也可用适量液氮或氧化铝）研磨，须尽量磨细样品，加预热（56℃）缓冲液B 3.5～4mL于研钵中，混匀，将钵体上的中药粉末尽量洗下；②将钵中乳状液体倒入10mL离心管中，用封口胶封好，将离心管平放于摇床上，温育30min（56℃），其间不断振荡，每隔10min左右转动管体180°，离心10min（10000r/min），上清液倒入另一离心管，加入2/3倍体积2.5mol/L（pH4.8）的醋酸钾溶液，置－4℃冰箱30min，离心10min（10000r/min），上清液倒入另一离心管，加入等体积氯仿-异戊醇混匀（盖紧试管盖，反复颠倒60～100次），4℃离心15min（10000r/min），如蛋白较多，可重复一次；③上清液移入另一离心管，加2/3倍体积预冷异丙醇，混匀后放入－20℃冰箱30min，4℃离心20min（10000r/min），沉淀核酸，吸去上清液，所得DNA沉淀用70%乙醇洗2次（不能将沉淀打碎），吸去乙醇，倒置试管于吸水纸上，于无菌台上用风机吹干，加入TE溶液300～400μL（视沉淀大小而定），置4℃保存备用。

4. 提取中有关问题说明

对于多糖含量较高的样品，可在研磨之后，增加一次去水溶性杂质的步骤，即加入8mL纯水，将样品洗入10mL塑料离心管，60℃水浴温育10min；离心10min（10000r/min），去上清液，然后加入预热缓冲液B 3.5～4mL至有沉淀的离心管中。其他步骤同前。

四、多糖、多酚与其他次生物质的去除

与动物细胞不同，植物细胞具有加厚的次生壁和硕大的液胞，因此植物细胞储存了大量的、种类繁多的次生物质，例如多糖、多酚、乳汁、树脂等，使得植物 DNA 的提取与纯化比动物和微生物要难得多。这些次生物质在提取 DNA 的过程中与 DNA 共沉淀，形成黏稠的胶状物难以溶解或产生褐变。如此质量的 DNA 既不能做酶切位点分析又不能做 PCR 扩增，因为上述次生物质的存在严重地抑制限制性内切酶和 Taq DNA 聚合酶的活性。因此，去除多糖与多酚等次生物质成为提取与纯化植物 DNA 的关键步骤。

1. 材料的选择与处理

供提取 DNA 的植物材料应尽量新鲜或是幼嫩。有可能时应尽量采用种子萌发的幼苗，采收成熟的幼叶提取 DNA。从野外采集的新鲜叶片若比较衰老，运回后可放在 4℃的黑暗中饥饿 1～2 天，以消耗淀粉和其他多糖。

2. 在细胞裂解之前分离细胞核

细胞总 DNA 的 85%存在于细胞核中，若不是做叶绿体或线粒体基因组的研究可先将细胞核分离出来。在研磨之后细胞壁已破碎，果胶类多糖已释放出来，但大部分核膜、质体膜甚至液胞膜还是完整的。此时用低速离心（2000r/min 或 5000～7000r/min）收集沉淀，可有效地将细胞核（在沉淀中）与保留在上清液中的多糖和多酚类次生物质分开。进行这步操作时，研磨介质中不加去垢剂以保持核膜的完整性。

3. 提取介质的组成

细胞膜的裂解需借助于去垢剂的作用，常用的去垢剂有 SDS 和 CTAB，提取植物基因组 DNA 时更常用的是 CTAB。核酸与 CTAB 在不同的盐浓度下选择性地生成沉淀。当 NaCl 浓度为 0.7mol/L 时，RNA 和 DNA 溶于 CTAB，当盐的浓度降至 0.4mol/L 时核酸沉淀，但在 DNA 溶解的盐浓度下许多多糖不溶解，此时 CTAB 与多糖和残留的蛋白质形成复合物，它们在以后乳化和用酚或氯仿抽提时停留在界面上，容易去除。在提取介质中最常用的是 2%CTAB，在多糖含量高的类群如海藻（Aitchitt et al，1993）和山龙眼（Maguire et al，1994）的提取中可增至 3%。

为了去除多酚类次生物质，在提取介质中必须加抗氧化剂，最常用的有 β-巯基乙醇、抗坏血酸钠、半胱氨酸、二硫苏糖醇（DTT）等。它们共同的作用是提供 SH—（巯基），与多酚类物质竞争氧，因而有效地防止了酚氧化成酸，避免了褐变。所用抗氧化剂的种类与用量依植物类群而定，最常用的是 β-巯基乙醇，其终浓度范围是 0.1%～2%（体积分数），在一些多酚含量高的类群中，例如莲、亚麻等，β-巯基乙醇的终浓度可高达 5%，所有抗氧化剂都要在研磨前临

时加入，否则无效。

PVP是一种聚合物，常用PVP40（相对分子质量为40000），它与多酚结合形成一种不溶的络合物，因此也能有效去除酚，通常与抗氧化剂一起使用，终浓度为20～60g/L。也有报道在提取棉花DNA的介质中加入多酚氧化酶的抑制剂，如1g/L二乙基二硫氨基甲酸（diethyldithiocarbanuc acid，DIECA）可有效去除酚。

提取介质的pH值通常为8.0，有报道低pH值（5.5）可避免酚类物质的电离化和随后的氧化。也有报道在研磨后加入提取介质之前，用－20℃预冷的丙酮抽提2次，提取核酸的效果好。

4. 高浓度盐去多糖

在氯仿-异戊醇（24∶1）抽提后的水相中加入0.5体积的5mol/L的NaCl，然后再加2倍体积的乙醇使DNA沉淀，此时大部分多糖仍在上清液中。这种简单、迅速和便宜的方法可有效去除植物DNA中的多糖。实验证明在DNA的水溶液中，NaCl的终浓度为0.5～3.0mol/L都能去糖，但2.0mol/L的效果最好。

5. CTAB-NaCl溶液提取与氯仿-异戊醇抽提取

将现有DNA样品的NaCl浓度调到0.7mol/L，加0.1体积的CTAB-NaCl（溶解4.1gNaCl于80mL H_2O 中，在加热和搅拌下缓慢地加入CTAB，如果需要，加热到65℃使溶解，定容到100mL），混匀后用氯仿-异戊醇（24∶1）抽提，产生的白色界面表明多糖与其他大分子污染物去除。重复用CTAB-NaCl溶液提取与氯仿-异戊醇抽提几次，直到白色界面消失为止。

6. 糖苷水解酶的使用

在DNA的粗提液中同时加入RNase与糖苷水解酶（例如Caylase M_3）的混合物，去除RNA与果胶类多糖可在一步完成。用此法得到的DNA制剂去除了与DNA共沉淀的胶体状物质，没有RNA的污染，它的 A_{260}/A_{280} 大约为1.8。多糖的种类很多，因此在实际应用中也要求有不同种类的糖苷水解酶，加之酶制剂比较昂贵，因此这个方法不一定实用。Caylase M_3 虽然水解多糖效果好，但此酶常被核酸酶污染，不好用。

7. 几种柱色谱方法去多糖

RPC-5反向柱色谱是一种分离与纯化核酸强有力工具，迅速而便宜。原来这种柱已成功地用于植物总tRNA以及细胞器tRNA的分离，后来发现它也能有效地改善用任何方法提取的DNA纯度。这样纯化过的DNA适于做PCR扩增和限制性酶切等各种分析。也有报道，用Sephacryl S-1000（Sigmas：allyl dextran与 N，N'-methylenebi-sacrylamide交联的共聚物，一种凝胶过滤的介质）凝胶过滤，结合PEG 8000沉淀能有效去除可溶性多糖，他们认为这种方法优于用2mol/L NaCl/乙醇沉淀去多糖。

8. 稀释 DNA 制剂

经验显示进行 RAPD 这类 PCR 扩增时，每一反应的模板 DNA 可少至 2ng，因此在一般情况下，初步纯化的 DNA 制剂（经上述某个合适的方法去多糖和去多酚）稀释到 PCR 扩增的有效浓度（2ng/反应），就能得到好的扩增。

多糖是改变 PCR 缓冲液的 pH 值或抑制 Taq DNA 聚合酶的活性，而不是与 DNA 结合。一般认为稀释 DNA 提取液是排除多糖抑制作用的最有效途径。在实际操作时，主要应考虑所研究植物类群的特点，根据多酚和多糖的种类与含量的高低选择既有效又经济的措施。

第五节　动物药 DNA 的制备

一、材料的预处理

提取 DNA 用的动物药新鲜和干燥样品均可。对于一般的新鲜动物组织，可立即剪碎（或匀浆；也可剪成小块，液氮研磨粉碎），加入适当的消化裂解液温育后直接用苯酚-氯仿法进行 DNA 提取。对于动物中药干品则宜洗净烘干后，玻璃砂研磨粉碎（或用其他方法粉碎），加入裂解液保温过夜后进行 DNA 提取。

由于动物药涉及多种不同的生物体及组织细胞，结构成分各异，因而处理方法也有不同，所以选材和操作可参阅有关具体研究报道。

二、试剂与材料

细胞消化裂解液：Tris-HCl 0.01mol/L（pH8.0），EDTA 0.01mol/L，NaCl 0.1mol/L，SDS 2%，蛋白酶 K 20μg/L，DTT 0.039mol/L。

TE 缓冲液（pH8.0）等其他试剂同本章第四节植物药 DNA 的制备。

三、原理和方法

1. 新鲜动物药的 DNA 提取

一般采用苯酚-氯仿法。

2. 干燥动物药的 DNA 提取

一般先将材料洗净粉碎处理后，采用苯酚-氯仿法或 CTAB 法进行 DNA 提取，有些样品（如海龙等），采用低 pH 值法提取 DNA 也可得到较好的结果。其提取方法如下（以龟甲与鳖甲为例）：①称取龟甲与鳖甲各 1～2g，用双蒸水和去污剂洗涤去除表面污物，最后用双蒸水洗干净并在 60℃下烘干，在离紫外灭菌灯约 20cm 处照射，正反两面均照射约 30min，以彻底破坏表面外源 DNA；②用干净灭菌的铜药臼将骨片捣成粉末，并将其转入离心管中（取 1 个管作阴性

对照），加入20倍左右的0.5mol/L的EDTA（pH8.0），56℃脱钙约72h，中间换2次新鲜的EDTA溶液；③加入消化裂解液5mL，56℃水浴保温过夜，酚-氯仿抽提，乙醇沉淀等操作过程同新鲜组织，样品DNA沉淀用TE缓冲液（pH8.0）溶解后，保存于4℃备用。

第六节 常用中药鉴定举例

1. 当归

【来源】 本品为伞形科植物当归［*Angelica sinensis*（Oliv.）Diels］的干燥根。

【RAPD鉴别】

（1）材料 见表7-3。

表7-3 样品来源

编号	学名	产地	编号	学名	产地
1	*Angelica sinensis*	武都01	10	*A. sinensis*	漳县02
2	*A. sinensis*	武都02	11	*A. sinensis*	岷县01
3	*A. sinensis*	武都03	12	*A. sinensis*	岷县02
4	*A. sinensis*	武都04	13	*A. sinensis*	岷县03
5	*A. sinensis*	南坪01	14	*A. sinensis*	岷县04
6	*A. sinensis*	南坪02	15	*A. sinensis*	岷县05
7	*A. sinensis*	南坪03	16	*A. sinensis*	岷县06
8	*A. sinensis*	宕昌01	17	*A. sinensis*	岷县07
9	*A. sinensis*	漳县01	18	*A. sinensis*	岷县08

（2）方法

① DNA的提取 采取CTAB法。取叶片1g，用液氮研磨成粉末，研磨时加入0.2g PVP粉。研磨后立即加入2mL CTAB提取缓冲液［200mmol/LTris-HCl（pH8.0），0.25mmol/L EDTA（pH8.0），250mmol/L NaCl，0.5%SDS，0.5%β-巯基乙醇］，60℃水浴保温45min，加入等体积的氯仿-异戊醇（24∶1），反复轻摇混匀，离心10min（5500r/min）。取上层水相，再加入等体积的氯仿-异戊醇（24∶1），反复轻摇混匀，离心10min（5500r/min），重复2～3次，直到水相层绿色不明显。在水相中加入2/3体积的预冷的异丙醇，于－20℃静置30min以上。离心10min（10000r/min），沉淀用300μL TE［10mmol/LTris-HCl（pH7.6），0.1mmol/L EDTA（pH8.0）］溶解，加入RNaseA，终浓度为20μg/mL，37℃保温1h，然后分别用等体积平衡酚、平衡酚-氯仿（1∶1）及氯仿-异戊醇（24∶1）各抽提1次。吸取上层水相，加入等体积异丙醇沉淀DNA，离心10min（1000r/min），沉淀用75%冰醋酸洗涤1～2次，干燥后用200μL TE

溶解，−20℃保存备用。

② PCR反应　参照William的方法。从200个随机引物中筛选出20个RAPD引物进行PCR扩增。反应总体积为25μL，内含模板DNA1～10ng，引物0.2μmol/L，dNTP各0.1mmol/L，1U Taq DNA，Tris-HCl（pH8.3）10mmol/L，KCl 50mmol/L，$MgCl_2$ 2.5mmol/L，明胶（gelatin）0.001%，上盖有25μL石蜡油。PCR扩增反应在Gene Cycler™型DNA扩增仪上进行。反应循环为：90℃，1min；35℃，2min；72℃，2min；5个循环后改为94℃，30s；35℃，1min；72℃，2min；40个循环后于72℃延伸5min。PCR扩增产物于1.3%琼脂糖（内含1μg/mL EB）凝胶中进行电泳检测。

③ 数据处理　任意两个样品之间的遗传距离（D）可以通过以下公式进行计算：$D=1-F$，其中F为两个样品RAPD标记的共享度，$F=N\text{xy}/(N\text{x}+N\text{y})$，$N$xy为样品x和样品y PCR扩增产物分子量相同的DNA片段总数，Nx、Ny分别为样品x和样品y的PCR扩增产物的DNA片段总数。根据遗传距离（D），利用UPGMA（unweighted pair method witharithmetic mean）法进行聚类分析，并构建聚类树状图。

（3）结果　见表7-4、图7-1、图7-2。

表7-4　筛选出的10个引物的序列

引　物	序　列	引　物	序　列
oligo 1006	GCTCTCTGGC	oligo 1058	TGTGGAAGCG
oligo 1021	TGAGTAACCG	oligo 1064	GGGGAACGCG
oligo 1034	ACCCTTCCCG	oligo 1089	CTGGGATGCG
oligo 1043	GATCCCGCCG	oligo 1094	CCTTGCTGCG
oligo 1050	CTCTCCTCCG	oligo 1098	CCAGAAACCC

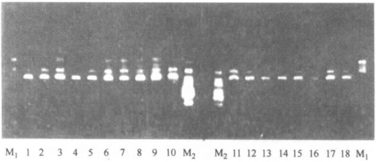


图7-1　引物oligo 1098 PCR扩增产物的电泳图谱

（1～18为样品编号；M_1为Heb ladder；M_2为λDNA/Hae+*Hind*Ⅲ）

〖附〗 ① 采用25个10 bp的随机引物进行扩增，从中筛选出谱带清晰并呈多态性的引物共10个。每个引物扩增的DNA片段数为3～9个，筛选出的10个引物在每个样品中获得的DNA片段总数平均为55个。

根据筛选出的 10 个引物的 PCR 扩增结果，计算了各样品间的遗传距离。根据遗传距离，利用聚类分析构建了不同产地当归 18 个样品的聚类树状图。

② 聚类分析结果综合显示了不同产地的 18 个当归样品由 10 个筛选出的引物进行 PCR 扩增的结果。表明绝大多数地理分布距离越近的样品，如 1～3 之间、5～7 之间、9～10 之间及 11～18 之间，在聚类树状图上的距离越近，说明它们之间的遗传背景差异越小。反之，地理分布距离越远的样品，如上述各组之间，在聚类树状图上的距离越远，说明它们之间的遗传背景差异越大。但生态条件特别是小生境对当归遗传差异的影响亦不可忽视，如 4 号样品和 1 号、2 号、3 号样品之间在地理分布距离上虽然较近，但在分子系统树上的距离却较远，说明它们之间的遗传差异较大，这可能是由于样品之间小生境的不同造成的。此外，还显示在当归道地产区甘肃省岷县采集的 8 个样品（11～18 号样品）中，12 号与 17 号、18 号样品，11 号与 15 号样品，16 号与 13 号、14 号样品之间在分子系统树上的距离更近，表明它们在遗传背景上更为接近。

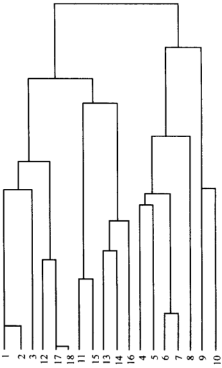


图 7-2　18 个当归样品的 RAPD 聚类树状图（1～18 为样品编号）

2. 人参

【来源】 本品为五加科植物人参（*Panax ginseng* C. A. Mey.）的干燥根。

【AFLP 鉴别】

（1）材料　人参、西洋参、引种西洋参。

（2）仪器　480 型基因扩增仪；Seqi-Gen™ 电泳测序系统等。

（3）试剂　AFLP™ Analysis System Ⅱ（GIBCO BRL 公司），PVP，Taq DNA 聚合酶等。

（4）方法

① DNA 的制备　取样品用 75％乙醇消毒，刮弃表皮，取组织 1g，置小研钵中，加入液氮研磨成粉，将其转移到 50mL 塑料离心管中，立即加入保温 60℃的 6×CTAB 提取液［CTAB 6％，Tris-HCl（pH8.0）100mmol/L，EDTA 20mmol/L，NaCl 1.4mol/L，巯基乙醇 2％，PVP 5％］混匀，60℃保温 1h，并

不时振摇。冷却至室温后加入等体积的氯仿-异戊醇（24∶1）抽提，轻轻颠倒混匀，离心 10min（14000r/min），吸取上清液加入 1/10 体积预热 65℃的 10% CTAB/NaCl 溶液（10%CTAB，0.7mol/L NaCl），室温下孵育 10min，加入等体积的氯仿-异戊醇（24∶1）重复抽提 1 次，吸取上清液加入等体积的 1× CTAB 沉淀缓冲液［CTAB 1%，Tris-HCl（pH8.0）50mmol/L，EDTA 10mmol/L，巯基乙醇 1%］，轻轻颠倒混匀，60℃保温 30min，离心 10min（9000r/min），小心去上清液，然后加入高盐 TE 溶液［Tris-HCl（pH8.0）10mmol/L，EDTA 0.1mmol/L（pH8.0），NaCl 1mol/L］1mL 溶解 CTAB-DNA 沉淀复合物，加入 2.5 倍体积的无水乙醇，室温下放置 1h，离心 10min（9000r/min），去上清液后，分别用 65%和 85%乙醇各洗涤 2 次，弃洗液，自然干燥后并溶于 TE 溶液［Tris-HCl（pH8.0）10mmol/L，EDTA 0.1mmol/L］400μL 中。

② 电泳及 DNA 浓度和纯度的测定　取样品 DNA 10μL 与上样缓冲液 2μL 混匀，上样于 0.8%琼脂糖凝胶上，用 1×TBE 电泳缓冲液，5V/cm 电泳 30min，0.5μg/mL 溴化乙锭染色后，紫外灯下观察结果并照相；取一定量样品 DNA，稀释 50 倍，于分光光度计测定 A_{260} 和 A_{280} 值，DNA 纯度根据 A_{260}/A_{280} 之比值判断。

③ 基因组 DNA 的 *Eco*RT/*Mse* Ⅰ 酶切　反应体系 25μL 中含有 5×5μL 反应缓冲液，人参、西洋参、引种西洋参基因组均为 250ng，对照拟南芥菜（*Arabidopsis thaliana*，Ara）DNA250ng，*Eco*RT/*Mse* Ⅰ 2.5U，37℃反应 2h 后，70℃孵育 15min 以灭活限制酶活性，离心反应管收集反应体系，并置于冰上。

④ *Eco*R Ⅰ/*Mse* Ⅰ 基因组 DNA 片段与人工接头的连接　在上述 *Eco*RT/*Mse* Ⅰ 酶切后产物中，加入人工接头溶液［*Eco*RT/*Mse* Ⅰ 人工接头，ATP 0.4mmol/L，Tris-HCl（pH7.5）10mmol/L，Mg（Ac）$_2$210mmol/L，KAc 50mmol/L］24μL，T4 DNA 连接酶 1U。室温轻轻混匀，于 20℃反应 2h，并取连接反应产物 10μL 用 TE 稀释 10 倍，混匀，作为 AFLP 预扩增反应的模板，余下的连接产物于－20℃保存。

⑤ AFLP 预扩增反应　反应体系 50μL 含上述稀释模板 5μL，预扩增引物混合物（含 dNTP）40μL，10×PCR 反应缓冲液［Tris-HCl（pH8.4）200mmol/L，$MgCl_2$ 15mmol/L，KCl 500mmol/L］，Taq DNA 聚合酶 1U。离心混匀，并在反应体系表面覆盖 2～3 滴矿物油。94℃ 30s，52℃ 1min，72℃ 1min，循环 20 次。以作为下一步选择性 AFLP 扩增反应的模板。

⑥ 选择性 AFLP 扩增反应　混合体系 1（Mix1）50μL 含 *Eco*RT 引物（E-AA）5μL、*Mse* Ⅰ 引物（M-CAG 含 dNTP）45μL；混合体系 2（Mix2）100μL 含消毒蒸馏水 79μL、10×PCR 缓冲液 20μL、Taq DNA 聚合酶 2.5U；选择性

AFLP扩增反应体系20μL含Mix1 5μL、Mix2 10μL、预扩增反应产物5μL。离心混匀，反应体系表面覆盖2～3滴矿物油。94℃ 1min，65℃ 1min，72℃ 1.5min，接着每循环一次降低退火温度1℃，循环9次；再接着94℃ 30s，56℃ 30s，72℃ 1min，循环23次。

⑦ 聚丙烯酰胺凝胶电泳及$AgNO_3$染色　选择性AFLP扩增产物分别加入等体积（20μL）甲酰胺染料（甲酰胺98%，EDTA 10mmol/L，溴酚蓝，二甲苯氰），离心混匀，94℃加热变性3min，立即置于冰上。取上样缓冲液3μL于6%聚丙烯酰胺凝胶（丙烯酰胺-亚甲基双丙烯酰胺20∶1，尿素7.5mmol/L，1×TBE电泳缓冲液），40W恒功率预电泳20min后，再取PCR产物10μL上样于凝胶孔中，40W恒功率电泳，直到二甲苯氰迁移至凝胶2/3长度，停止电泳，时间约2h。然后将玻板与凝胶分离，凝胶牢固附着于黏合硅烷处理的玻板上，并将其浸入固定溶液（乙醇10%，乙酸0.5%）中孵育3min，接着在含0.2% $AgNO_3$上述固定液中孵育5min，双蒸水漂洗20s，迅速置显色溶液（NaOH 3.0%，甲醛0.5%）染色至背景均匀，DNA带清晰，固定溶液孵育5min，蒸馏水漂洗10min，自然干燥。

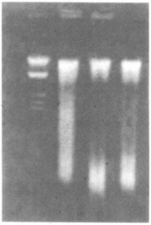


图7-3　人参等电泳图谱

1—人参（中国吉林）；2—西洋参（美国威斯康斯）；3—引种西洋参（中国吉林）；M—DNA/*Eco*RⅠ+*Hind* Ⅲ片段

⑧ 数据分析　电泳照片经计算机图像扫描仪扫描，经转换后形成标准图像文件（BMP）并存于TIF文件中，用DNA Simdex™ Version 3.0软件计算，求其相似度指数（similarity Index，SI）。

（5）结果　见表7-5、图7-3、表7-6、图7-4。

表7-5　不同植物基因组DNA的吸光度测定结果

样　品	A_{260}	A_{280}	A_{260}/A_{280}
人参(中国吉林)	0.048±0.002	0.027±0.003	1.78
西洋参(美国威斯康斯)	0.064±0.004	0.037±0.004	1.73
引种西洋参(中国吉林)	0.045±0.004	0.025±0.003	1.80

【附】

① 药用植物人参、西洋参、引种西洋参的干燥根组织中提取的DNA，经*Eco*RT/*Mse*I酶切后，分别将酶切片段与人工接头作进一步的连接，使用E-AA和M-CAG选择性引物对，构建栽培人参、西洋参、引种西洋参干燥根组织特定的基因组AFLP DNA指纹图谱，获得的DNA指纹多态性数目比RAPD、RFLP高得多。

表 7-6　相似度指数测定结果

样　　品	相似度指数	样品	相似度指数
PG 与 PQ	0.63±0.03	PG 与 Ara	0.23±0.03
PG 与 PQ′	0.65±0.02	PQ 与 Ara	0.29±0.02
PQ 与 PQ′	0.76±0.02	PQ′与 Ara	0.25±0.01

注：PG—人参（中国吉林）；PQ—西洋参（美国威斯康斯）；PQ′—引种西洋参（中国吉林）；Ara—拟南芥菜。

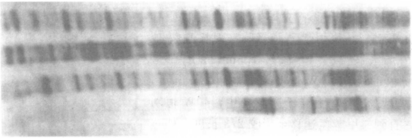


图 7-4　人参等植物的 AFLP 图谱

1—人参（*Panax ginseng*）（中国吉林）；2—西洋参（*P. quinquefolium*）（美国威斯康斯）；3—引种西洋参（*P. quinquefolium*）（中国吉林）；4—拟南芥菜（*Arabidopsis thaliana*）

② 应用 DNA Simdex^{TM} Version 3.0 软件对上述 DNA 指纹进行二维图像处理，对 DNA 指纹图谱的条带进行自动识别与定位，并计算出不同样品间相似度指数。从计算出的相似度指数显示，人参与西洋参基因组 DNA 指纹的相似度指数较高。此外，西洋参与引种到我国吉林的西洋参 DNA 指纹的相似度为 0.76，提示引种西洋参的遗传物质——基因组 DNA 与西洋参相比，仍有一定的变异。

3. 浙贝母

【来源】 本品为百合科植物浙贝母（*Fritillaria thunbergii* Miq.）的干燥鳞茎。

【特异 PCR 鉴别】

(1) 材料　托里贝母（*Fritillaria tortifoliae* X. Z. Duan et X. J. Zheng）、裕民贝母（*F. yuminensis* X. Z. Duan）（新疆）的新鲜鳞茎，浙贝母的幼苗、新鲜叶片与鳞茎，浙贝母的蜡叶标（浙江），浙贝母商品药材。

(2) 方法

① DNA 的提取与含量测定

SDS 法：取托里贝母和浙贝母的新鲜鳞茎各 200mg，在液氮下研磨后，加入 DNA 提取液（25mmol/L Tris-HCl，pH8.0，50mmol/L EDTA，0.5%SDS，0.2%β-巯基乙醇）1mL，56℃下保温提取 15min 后，加入等体积的苯酚-氯仿（1∶1）提取 15min，4℃，离心 15min（5000r/min），上清液加等体积的苯酚-氯

仿（1∶1）重复提取1次，离心后，上清液加入1/10体积的3mol/L醋酸钠和2倍体积的100％乙醇，4℃，离心15min（14000r/min），弃上清液，沉淀溶于去离子水100μL中。

CTAB法：同上样品，加入1×CTAB提取液（2％CTAB，100mmol/L Tris-HCl，pH8.0，20mmol/L EDTA，pH8.0，1.4mol/L NaCl，1％PVP）1mL，56℃下保温提取15min，加入等体积的苯酚-氯仿（1∶1）提取15min，4℃，离心15min（5000r/min），上清液加1/10体积的10％CTAB（10％CTAB，0.7mol/L NaCl），再加入等体积的苯酚-氯仿（1∶1）重复提取1次，离心，上清液加入1×CTAB沉淀缓冲液（50mmol/LTris-HCl pH8.0，10mmol/L EDTA，1％CTAB），离心后，弃上清液，沉淀用70％，100％乙醇洗两次，溶于去离子水100μL中。

DNA_{zol}，Reagent法：同上样品，加入1mL DNA_{zol} Reagent（Genomic DNA isolation reagent，GiBco-BRL），4℃，离心15min（15000r/min），上清液加2倍体积的100％乙醇，4℃，离心15min（15000r/min），弃上清液，沉淀用95％乙醇洗后，置室温下干燥15min，加8mmol/L NaOH 100μL溶解。

提取的总DNA经1％琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色后在紫外灯下观察拍照（U. V. Transillu minator，IS-1000 digital imaging system，Alpha Innotech Corporation）。用Gene Quant Ⅱ DNA/RNA Calculator（Pharmacia）测定A_{260}及$A_{260/280}$，并计算DNA含量。

② PCR扩增　PCR反应混合液体积为50μL，包括10×PCR反应缓冲液（含$MgCl_2$）5μL，10mmol/L dNTP1μL，引物S-1，AS-1浓度均为0.06μg/μL各2.5μL，1UTaq DNA聚合酶，1μg DNA模板。PCR反应混合液用石蜡油30μL覆盖。每个反应为30个循环，每个循环包括94℃变性1min，53℃退火2min，72℃延伸2min，首次循环前先在94℃预变性5min，最后一次循环后在72℃延伸5min。PCR产物经1％琼脂糖凝胶电泳，溴化乙锭染色后在紫外灯下观察拍照。

（3）结果　见表7-7、图7-5、表7-8、图7-6、图7-7。

表7-7　不同提取方法得到的DNA测定结果

样品	方法	A_{260}	$A_{260/280}$	DNA的含量/$\mu g \cdot \mu L^{-1}$
托里贝母	Ⅰ	0.371	1.343	1.29
	Ⅱ	0.046	1.254	0.16
	Ⅲ	0.233	1.461	0.81
裕民贝母	Ⅰ	0.442	1.454	1.54
	Ⅱ	0.045	1.069	0.15
	Ⅲ	0.220	1.449	0.77

注：DNA含量＝A_{260}×0.05×稀释倍数。

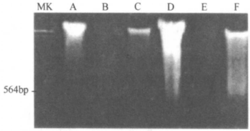


图 7-5 DNA 凝胶电泳图谱

MK—λDNA/*Hind*Ⅲ marker；A，B，C—托里贝母Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ；
D，E，F—裕民贝母Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ

表 7-8 Ⅰ法处理的不同浙贝母的数据对比（$n=3$）

样　　品	A_{260}	$A_{260/280}$	DNA 的含量/$\mu g \cdot \mu L^{-1}$
新鲜叶片	0.327	1.704	1.145
用琼脂糖凝胶干燥的叶片	0.179	1.040	0.627
植物标本	0.375	1.007	1.313
新鲜鳞茎	0.174	1.605	0.609
干燥鳞茎	0.344	1.534	1.204
生药	0.337	0.766	1.180

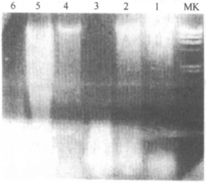


图 7-6 浙贝母 DNA 琼脂糖电泳图谱

MK—λDNA/*Hind*Ⅲ marker；1—新鲜叶片；2—用琼脂糖凝胶干燥的叶片；
3—植物标本；4—新鲜鳞茎；5—干燥鳞茎；6—生药

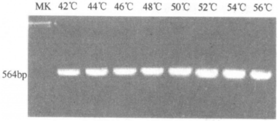


图 7-7 不同温度的 PCR 琼脂糖凝胶电泳图谱

MK—λDNA/*Hind*Ⅲ marker；42～56℃—参考不同的退火温度

4. 麻黄

【来源】 本品为麻黄科植物草麻黄（*Ephedra sinica* Stapf）、木贼麻黄（*E. equietina* Bunge）或中麻黄（*E. intermedia* Schrenk et C. A. Mey.）的干燥草质茎。

【DNA 片段的克隆与序列分析】

（1）材料 麻黄均为新鲜幼枝叶。兰麻黄（*E. glauca* Reget）和膜果麻黄（采自于库车县）。

（2）仪器 5700 型定量 PCR 仪（PE 公司），Wizard Genomic DNA Purification Kit、acetylated BSA（购自美国 Promega 公司）等。

（3）方法

① 新疆麻黄的 RAPD 分析 基因组 DNA 的提取方法采用高盐低 pH 值法。并于 260nm 处定量。用 40 条随机引物，分别扩增 4 个 DNA 样品，从中筛选出重复性好、多态性高的 20 条引物，全部用于麻黄样品基因组 DNA 的扩增。PCR 扩增反应在 PE 公司 5700 型定量 PCR 仪上进行，反应总体积为 25μL。其成分为：10×PCR butffer 2.5μL，2.5mmol/L $MgCl_2$ 2μL，10mmol/L dNTP 1μL，25ng/μL 模板 DNA 1μL，10pmol/μL 引物 1μL，5mol/(L/μL) Taq DNA 聚合酶 0.3μL，ddH_2O 17.3μL。扩增程序为：首先，95℃预变性 2min，然后进行以下 40 个循环：94℃变性 40s，36℃退火 60s，72℃延伸 120s，最后 72℃延伸 7min。取 10μL 扩增产物在 1.5%琼脂糖凝胶中电泳，EB 染色后拍照。

② 新疆中麻黄 DNA 片段序列的测定与分析 按试剂盒操作手册对随机引物 S13（序列为：TTCCCCCGCT）的 PCR 产物中 750bp 左右的片段进行回收。按照手册与 pMD18-T 载体进行连接，转化至 DH5α 感受态细胞，通过酶切鉴定阳性克隆测定序列。

（4）结果 见图 7-8、图 7-9、图 7-10。

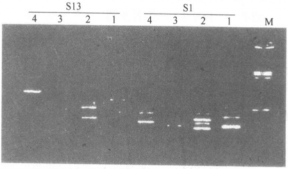


图 7-8 S1 和 S13 引物扩增的 4 种麻黄 RAPD 产物

M—DL 2000+DL 15000 marker；1—木贼麻黄；2—中麻黄；3—兰麻黄；4—膜果麻黄

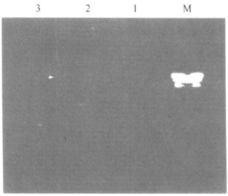


图 7-9　重组质粒电泳结果

1—阴性克隆质粒；2,3—阳性克隆质粒；M—λDNA/*Hind* Ⅲ marker

5′c? nGACGGCC AGTGCCAAGC TTGCATGCCT GCAGG
TCGAC GATTTTCCCC CGCTGGCCCT ATTATGCCTC T
ATCCCTGAG TATAGTGTAG GCTTGAACTA ATAAAA
CATG TCCTAAATTA AGAAGGGGAT AAATGCATAT
TAAAGAGGCA TATTAACTAA AATTATTGTA AGCGA
TATTT TAAAGAAGTA AAAAATAATT AAAAGCAAGT
AAAAAGTGCC CCAATATACA CTCATGAATC TTAATA
AAGA TGTTCTAAAG GATCATATTA ATTGTAAGAG
TAAAAAAGAA CACATTCACT AAGATACCCC ATGAT
AATAA AAAATTGTAG CTCCACAAAC TATTAATTAA
ACGAATCATA AGAAACTATC CTTTAAGAAA CTACC
TTATG ACGGGACAAG AAGGTTGATA GGTAACGACT
CCTTGAAGAA GTATGACCAA TAATGAATAA GGACC
AAAAG CTATTGATTG AAACAGAAAC ATGTGTTTGA
GGCAAATATC CTTTTTTGTC GAAAAAGACT ATTGCT
ATTA ATATTAAATA GAACTTGAAT ACAAAGAAAA
GTAGTAGCAA AGTTTACAAA TTACGGGAGT CTCTT
AAGCA ATCCCTCACA CTAGCGGAGG GATTGGGAGC
CTGAAGAGGG GGATGCTAAG AGGGAAGTTC TTAGC
AAGGA CACAACACAC AATTTACTTT CAAATGGAAA
GTTAAAACAA ATTACATGCT CATAAAAGGC CTTAT
TGCGT AATTTCCATA GTTCAAAGAG TACATTCAAT
TGAATTACGT TCCACTGCCA ATAGGACAAG GAGGT
AGCGG GGGAAAATCT CTAGAGGATC CCCGGGTACC
GAGCTCGAAT TCGTAATCAT GGTCATAGC 3′

图 7-10　新疆中麻黄阳性克隆质粒的测序结果

【附】 测出了新疆中麻黄 869bp 的 DNA 序列。序列结果通过 DNASIS 软件进行同源性序列分析。发现此次克隆的新疆中麻黄 DNA 片段全长 771bp。

5. 山参

【来源】 本品为五加科植物（*Panax ginseng* C. A. Mey）野生品的干燥根，又名山参。

【RAPD 鉴别】

（1）仪器　Thermojet 型扩增仪（比利时 Equibio 公司）等。

（2）引物和试剂

引物：S1-S60；OPH1-OPH20。

试剂：Taq DNA 聚合酶；游离脱氧核普三磷酸 DNTP 等。

试剂的组成：提取缓冲液 1g/L CTAB，50mmol/L Tris-HCl（pH8.0），0.7mol/L NaCl，0.17%巯基乙醇，10mmol/L EDTA，1% PVP。TE 缓冲液（pH8.0）：10mmol/L Tris-HCl（pH8.0），0.1mmol/L EDTA（pH8.0）。沉淀剂：氯仿-异戊醇（24：1）。1×TEA 电泳缓冲液：Tris 碱 242g，冰醋酸 57.1mL。1mol/L EDTA（pH8.0）50mL，加蒸馏水配成 5L 溶液，同时稀释 10 倍即得。

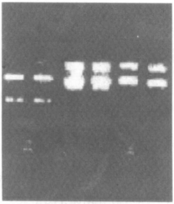
（3）方法

① 山参及栽培人参的特性分析　DNA 模板的提取和纯化：取标准山参及栽培人参各少量约 100mg 分别置于小研钵中，研成细粉，放入 1.5mL 微型离心管中，加入已预热至 60℃的 1×CTAB 提取缓冲液 600μL 左右，混匀，水浴上保温在 60℃，1h，其间适当取出轻轻摇晃数次，取出冷却至室温，加入等体积的氯仿-异戊醇（24：1）轻轻颠倒混匀。8000r/min，离心约 10min，吸取上清液至另一个 1.5mL 离心管中，加入原 2/3 体积的异丙醇（－20℃预冷），混匀后放入－20℃冰箱，保存 30min 左右，然后离心 10min（9000r/min），弃去上清液，加入 40μL TE 缓冲液溶解沉淀。溶解后再加 2 倍量无水乙醇混匀放入－20℃冰箱 2h 左右，取出后离心 10min（10000r/min），弃去上清液，沉淀用 75%乙醇洗涤一次，自然阴干，加入 100 倍无菌水溶解即得 DNA 模板样品。稀释 10 倍，作为扩增浓度。

聚合酶链反应（PCR）扩增：反应总体积为 25μL，其中引物 0.5μL（0.4mmol），DNA 模板 2μL，Taq 酶 0.1μL（0.5U），dNTP 1μL（0.2mmol/L），氧化镁 3μL（1mmol/L），10× buffer 2.5μL，双蒸馏水 15μL。再加石蜡 25μL，离心 5s（6000r/min），放入扩增仪。扩增程序为 94℃变性 3min，36℃复性 1min，72℃延伸 2min 为 1 个循环。94℃变性 1min，36℃变性 1min，72℃延伸 2min，40 个循环。72℃延伸 10min，1 个循环。

电泳：各取扩增产物 5μL 点样于含有 0.05%EB 的 1.5%～2%琼脂糖凝胶板上，用 1×TAE 缓冲液电泳，电压 100V，电泳 45min，经紫外检测摄影。

② 山参及山参粉产品的鉴定　山参产品的鉴定：DNA 的提取、扩增、电泳均按以上步骤进行。山参粉产品的鉴定：取 100mg 左右山参粉，置三角形小型滤纸漏斗顶尖部，用滴管点数滴 70%乙醇，然后晾干，取下粉末置于 1.5mL 离心管中，然后按前述方法加



1　2　3　4　5　6

图 7-11　山参和栽培人参粉末电泳图谱

1，2—山参粉末；3，4，5，6—栽培人参粉末

入已预热至 60℃的 1×CTAB 缓冲提取液……直至 DNA 扩增及其扩增产物电泳等各步骤操作完成。

(4) 结果 见图 7-11、图 7-12、图 7-13。

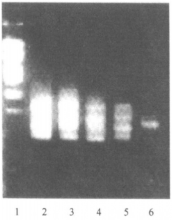


图 7-12 标准山参和栽培人参电泳图谱

1—marker；2，3，4，5—标准栽培人参；6—标准山参

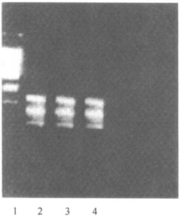


图 7-13 标准山参电泳图谱

1—marker；2，3，4—标准山参

【附】 采用两个系列 80 种引物扩增后发现引物 Sx、OP Hx 对山参和栽培人参中提取的 DNA 的扩增结果产生不同条带，然后经上述方法多次提取，都得到同样结果，说明该方法稳定，同时证实了山参与栽培人参的 DNA 条带的不同点被找到。特别是采用 Sx 引物扩增后产生的电泳结果说明在栽培人参、山参共有条带下产生一条带的人参为山参（该条带的位置差异仅受品种的产地影响）。

6. 甘草

【来源】 本品为豆科植物甘草（*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.）、胀果甘草（*Glycyrrhiza inflata* Bat.）或光果甘草（*Glycyrrhiza glabra* L.）的干燥根及根茎。

【RAPD 鉴别】

(1) 材料 采自于新疆，均为新鲜幼枝叶。

(2) 仪器和试剂 5700 型 PCR 仪（PE 公司）；PowerPAC 200 2.0A 型电泳仪（美国 Bio-Rad 公司）等。

(3) 方法

① 基因组 DNA 提取 取同一来源物种的 20 株幼嫩枝叶，称取 3g，液氮下粉碎处理提取基因组 DNA。

② 引物选择 选取 40 个 10 碱基长度的寡核苷酸随机引物，对 7 个 DNA 供试品进行预扩增，从中筛选出重复性好、多态性高的 20 个引物，用于甘草供试品基因组 DNA 的扩增。

③ PCR反应　反应总体积为25μL。扩增体系为：10×PCR缓冲液2.5μL，25mmol/L $MgCl_2$ 1μL，10mmol/L dNTP 1μL，25ng/pL 模板DNA 1μL，10μLmol/L引物1μL，5U/μL Taq DNA聚合酶0.3μL，ddH_2O 17.3μL。扩增程序为：95℃预变性2min，然后进行40个循环（94℃变性40s，36℃退火60s，72℃延伸120s），最后于72℃下延伸7min。取扩增产物10μL在1.5%琼脂糖凝胶中电泳，EB染色。

④ 数据处理　电泳图谱中的每一条带均代表了与模板DNA互补的一对结合位点，可记为一个位点，根据分子量标准对照反应产物在胶上的对应位置，估计扩增产物的分子量大小，有带的记为1，无带的记为0，形成0/1矩阵，进行带数统计。计算遗传系数F（$F=2Nab/Na+Sb$）和遗传距离D（$D=1-F$），利用UPGMA法进行聚类分析。

（4）结果　见表7-9、图7-14、图7-15。

表7-9　RAPD分析所用的引物

引物号	序　列	引物号	序　列
S121	ACGGATCCTG	S140	GGTCTAGAGG
S123	CCTGATCACC	S141	CCCAAGGTCC
S124	GGTGATCAGG	S142	GGTGCGGGAA
S125	CCGAATTCCC	S143	CCAGATACAC
S126	GGGAATTCGG	S152	TTATCGCCCC
S129	CCAAGCTTCC	S155	ACGCACAACC
S130	GGAAGCTTGG	S156	GGTGACTGTG
S131	TTGGTACCCC	S147	AGATGCAGCC
S133	GGCTGCAGAA	S159	ACGGCGTATG
S134	TGCTGCAGAA	S150	CACCAGGTGA

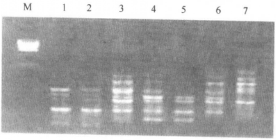


图7-14　1～7号供试品RAPD扩增产物的琼脂糖凝胶电泳图谱

1—喀什；2—尼勒克；3—乌鲁木齐；4—塔城；5—布尔津；6—和静；7—和静（栽培）；M—marker

【附】　通过20条引物对甘草6个不同地理群体的DNA供试品进行了RAPD分析，共检测到175个位点，位点范围在200～2500bp之间。和静人工栽培甘草位点最多，共计139个，塔城甘草位点最少，仅112个。

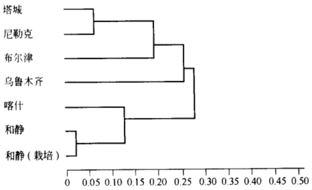


图 7-15 UPGMA 聚类图

不同产地的甘草基因图谱有一定的差异，产地距离越远，差异越大。人工栽培种与同一产地的野生种，基因图谱基本一致，仅有细微差异，说明人工栽培甘草变异不大。

7. 鹿茸

【来源】 本品为鹿科动物梅花鹿（*Cervus nippon* Temminck）或马鹿（*Cervus elaphus* L.）的雄鹿未骨化密生茸毛的幼角。

【DNA 序列分析】

（1）材料 天山马鹿血、东北马鹿血、梅花鹿血、易混品。

（2）仪器 377 型全自动 DNA 序列分析仪（美国 ABI 公司）等。

（3）方法

① DNA 提取和检测 取样品加入 20mL 含 1%巯基乙醇和 0.2mg/mL 蛋白酶 K 的消化液，于 56℃消化 2h 以上。加入 20mL 10%Chelex 溶液，于 98℃煮沸 30min，冷却后离心 10min（1200r/min），取上清液。用 2.5%琼脂糖凝胶电泳进行检测。

② DNA 扩增 目标片段为哺乳动物线粒体 DNA 中一段长约 520bp 的序列，扩增引物为 5′-ATGAATTGGAGGACAACCAGT-3′和 5′-GTACATGCT-TATATGCATGGGGC-3′（引物 1）。每一样品的扩增体积为 50μL，内含 1× buffer，1.5mmol/L $MgCl_2$，0.05mmol/L dNTP，0.5μmol/L 引物，2.0Unit Taq 酶以及 10ng 模板溶液。

目标片段为位于上述线粒体 DNA 中一段约 370bp 的序列，扩增引物为 5′-AGTCTTTGTAGTATACTC3′和 5′-ACATAGTATTCCTAATA3′（引物 2）。每一样品的扩增体积与浓度同上。

目标片段为线粒体 DNA 基因组细胞色素 b 基因中一个长度为 307bp 的片段，引物为哺乳动物线粒体 DNA 细胞色素 b 通用引物：5′-CCATCCAACAT-

CTCAGCATGATGAAA3′ 和 5′-GCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA3′（引物 3）。每一样品的扩增体积为 5μL，内含 1×buffer，3.0mmol/L $MgCl_2$，0.05mmol/L dNTP，0.5μmol/L 引物，2.0Unit Taq 酶以及 50ng 模板溶液。

上述扩增条件均为，96℃预变性 2min，接下来进行 40 个循环（95℃ 40s，52℃ 60s，72℃ 60s），最后在 72℃保温 5min。

③ DNA 序列分析　采用美国 ABI 公司 377 型全自动 DNA 序列分析仪。

（4）结果　见图 7-16。

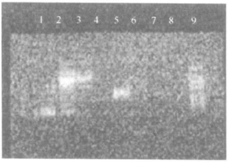


图 7-16　鹿茸、牛和伪鹿茸 DNA PCR 扩增后的琼脂糖凝胶电泳图谱

1～3—引物 3 进行扩增作阳性对照；
5～7—引物 2 的扩增结果；
4，8—相应的阴性对照；
9—DNA 分子量标记
（1，5—鹿茸；2，6—牛；3，7—伪鹿茸）

〖附〗用哺乳动物线粒体 DNA 引物（引物 1）对从不同产地梅花鹿和马鹿 7 个个体血中提取的总 DNA 进行 PCR 扩增和序列测定，得到线粒体 DNA 基因组中从细胞色素 b 基因末端 150bp 左右至 D-环的一段长度约为 520bp 左右的序列，将其与 Gen Bank 中一些常见伪充药材其来源于动物的线粒体基因组中同位置的序列比较，如与鹿同属偶蹄目的牛科动物家牛、山羊、猪科动物猪及奇蹄目马科动物家马，找到对于鹿保守性强且又与这些动物序列有明显差异的片段（对于不属于偶蹄目的其他动物，由于其亲缘关系与鹿更远，故该片段的差异更大）。合成这些片段，将其两两组合成 6 组，由于对于同一动物个体来说，全身各个器官的遗传物质 DNA 都是相同的。故将它们分别作为引物对从鹿茸和伪充药材中提取的总 DNA 进行 PCR 扩增，通过条件优化，筛选出一组能对鹿茸 DNA 进行扩增而不能扩增伪充药材 DNA 的特异性片段，作为鹿线粒体 DNA 种属特异的 PCR 引物，其序列为 5′AGTCTTTGTAGTATACTC3′和 5′-ACATAGTATGTCCTAATA3′（引物 2）。

8. 柴胡

〖来源〗本品为伞形科植物柴胡（*Bupleurum chinense* DC.）或狭叶柴胡（*Bupleurum scorzonerifolium* Willd.）的干燥根。

〖RAPD 鉴别〗

（1）材料　柴胡、竹叶柴胡（*B. marginatum* Wall. ex DC.）、大叶柴胡（*B. longiradiatum* Turcz）、小叶黑柴胡（*B. smithii* Wolff var. *parvifolium* Shan etY. Li.）、狭叶柴胡（*B.* scorzonerifolium Willd）的叶。

（2）仪器　温热混匀仪，PCR 仪等。

（3）方法

① DNA 提取　取新鲜叶约 200mg，用 ddH_2O 冲洗干净，吸去水分，剪成小片在液氮中研碎，转入 1.5mL 离心管中，加入 65℃预热的 2×CTAB 提取液（2% CTAB；Tris-HCl，pH8.0；20mmol EDTA，pH8.0；1.4mol/L NaCl）1mL，轻轻混匀，置温热混匀仪于 65℃，300r/min 下保温 2h，其间多次轻轻上下颠倒离心管使 DNA 提取充分。离心 5min（8000r/min），取上清液转移至另一离心管中，加入氯仿-异戊醇（24：1）萃取液，轻轻颠倒均匀，4℃，离心 10min（1000r/min），小心吸取上清液，自"加入氯仿-异戊醇……"起，酌情重复此步骤，直至两相间无沉淀物。吸取上清液，加 0.7 体积异丙醇沉淀 DNA，于－20℃放置 1～2h，4℃，离心 10min（1200r/min），弃去液体，在沉淀物中加入 50μL 70%乙醇，用枪头吸吐乙醇洗去沉淀，40℃，离心 5min（8000r/min），倒出上清液，重复一次。将离心管沉淀物置温热混匀仪，30℃烘干，加入 50μL ddH_2O 溶解，取 8μL 点样，经琼脂糖凝胶电泳检查后，－20℃保存备用。

② RAPD 分析　扩增反应在 20μL 的体系中进行，其中含有 10×buffer 缓冲液（无 Mg^{2+}）2μL，dNTP（2.5μmol/L）1.5μL，$MgCl_2$（25mmol/750μL）1.8μL，扩增引物（4μmol/L）1μL，模板 10～100ng，Taq 酶 0.2μL、加重蒸水补足 20μL。

③ PCR 反应程序　经 95℃预变性 5min，然后 95℃变性 50s，34℃复性 45s，72℃延伸 1min，完成 35 个循环后，72℃7min 补齐。扩增产物 20μL 加适量载样缓冲液，经 2%琼脂糖凝胶电泳，EB 染色检查。

④ 数据分析　电泳图谱中的每一条带（DNA 片段）均为一个分子标记，并代表一个引物结合位点，根据各分子标记的迁移率及其有或无，统计得所有位点的二元数据：有带（显性）、弱带或强带均计为 1，无带（隐带）计为 0，采用 SPSS10.1 软件对所得二元数据进行统计分析。

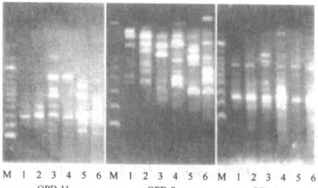
（4）结果　见表 7-10、图 7-17、图 7-18。

表 7-10　3 个有效引物及其扩增情况

引物名称	序列(5′-3′)	平态性片段	多态性片段	总片段
OPA-1	CAGGCCCTTC	1	17	18
OPD-8	GTGTGCCCCA	1	18	19
OPD-11	AGCGCCATTG	1	16	17
合计		3	51	54

【附】 DNA扩增结果多态性明显的有效引物 3 个，分别为 OPA-1，OPD-8，OPD-11。3 个有效引物共扩增 54 个 DNA 片段，平均每个引物扩增 18 个 DNA 片段，54 个片段中公共片段 3 个，显示多态性片段 51 个，占 94.4%。扩增结果

显示用OPA-1，OPD-8，OPD-11作随机扩增引物可以将北柴胡、狭叶柴胡、大叶柴胡、竹叶柴胡、小叶黑柴胡5种柴胡属植物完全区分开。



M—marker；1~6—样品编号

图 7-17　柴胡 RAPD 指纹图谱

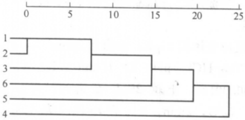


图 7-18　柴胡 RAPD 分析种系发生图

9. 姜黄

【来源】 本品为姜科植物姜黄（*Curcuma longa* L.）的干燥根茎。

【RAPD鉴别】

（1）材料　供试材料为新鲜叶片，来源于姜科姜黄属10个种，见表7-11。

表 7-11　用于 RAPD 分析的姜黄属植物

序号	植物名称	产地来源
1	姜黄 *Curcuma longa* L.	从四川双流县引种，道地产区
2	川郁金 *C. sichannensis*	从四川双流县引种，道地产区
3	温郁金 *C. wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling	从浙江瑞安县引种，道地产区
4	毛郁金 *C. aromatica* Salisb.	从广西药用植物园引种
5	蓬莪术 *C. phaeocanlis* Val.	从四川双流县引种，道地产区
6	顶花莪术 *C. yunnanensis* N. Liu & Senjen	从华南植物园引种，原产云南
7	黄莪术 *C. zedaaria* Rosc	从华南植物园引种，原产美国
8	广西莪术 *C. kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang	从广西横县引种，道地产区
9	印尼莪术 *C. xanthorrhiza* Roxb.	从华南植物园引种，原产印尼
10	细莪术 *C. exigua*	从华南植物园引种，原产四川

（2）仪器和试剂　Gene Gycler^{TM}型 DNA 扩增仪（Bio-Rad 公司），随机引物（Opperon Technologies 公司生产的十聚体核苷酸）。

（3）方法

① DNA 提取方法　采用 CATB 法，略有改动。取叶片 1g，用液氮研磨成粉状，研磨时加入 0.2g PVP 粉，立即加入 2mL CTAB 提取缓冲液（200mmol/L Tris-HCl pH 8.0，0.25mmol/L EDTA pH8.0，250mmol/L NaCl，0.5% SDS，0.5%β-巯基乙醇），60℃水浴保温 45min，加入等体积的氯仿-异戊醇混合液（24∶1），反复轻摇混匀，离心 10min（5500r/min）。取上层水相、再加入等体积氯仿-异戊醇（24∶1），离心 10min（5500r/min）。重复 2～3 次，直至水相层绿色不明显。在水相中加入 2/3 体积的预冷的异丙醇，于－20℃静置 30min 以上或过夜。离心 10min（10000r/min），沉淀用 300μL TE（10mmol/L Tris-HCl pH7.6，0.1mmol/L EDTA pH8.0）溶解，加入 RNaseA，终浓度 20μg/mL。37℃保温 1h，然后分别用等体积平衡酚、平衡酚-氯仿（1∶1）及氯仿-异戊醇（24∶1）各抽提 1 次。吸取上层水液，加入等体积异丙醇沉淀 DNA，离心 10min（1000r/min），沉淀用 75%冰醋酸洗涤 1～2 次，干燥后用 200μL TE 溶解，－20℃保存备用。

② PCR 反应　反应总体积 25μL，引物 0.2μmol/L，dNTP 各 0.1mmol/L，Taq DNA 酶 1U，Tris-HCl（pH8.3）10mmol/L，KCl 50mmol/L，$MgCl_2$ 2.5mmol/L，geatin0.001%，上覆 25μL 石蜡油。反应温度循环为：94℃，1min；35℃，2min；72℃，2min；5 个循环后改为 94℃，30s；35℃，1min；72℃，2min；40 个循环后于 72℃延伸 5min。扩增产物于 1.3%琼脂糖（内含 1μg/mL EB）凝胶电泳检测。

（4）结果　见图 7-19、图 7-20。

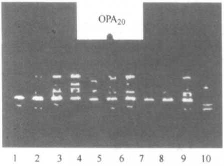


图 7-19　姜黄属植物基因组 RAPD 指纹图谱
OPA_{20}—引物

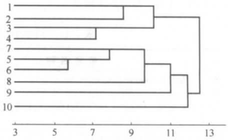


图 7-20　姜黄属植物 RAPD 聚类分析图

【附】　在筛选的 50 余个随机引物中有 25 个在供试材料上获得了较好的基因

组 DNA 多态性指纹图谱，其中 OPA_{20}、OPB_6、OPD_{18}、OPD_{20}、OPB_{14}、OPC_6、OPA_4、OPA_{15}、OPA_{16}、OPC_2、OPC_{11}、OPB_{15}、OPB_{16}、OPA_9、OPA_{16}等引物的扩增产物条带具有明显的特征性。

10. 厚朴

【来源】 本品为木兰科植物厚朴（*Magnolia officinalis* Rehd. et Wils.）与凹叶厚朴（*Magnolia officinalis* Rehd. et Wils. var. *biloba* Rehd. et Wils.）的干燥干皮、枝皮和根皮。

【DNA 鉴别】

（1）材料 厚朴、玉兰（*M. denudata* Desr.）、望春玉兰（*M. biondii* Pamp.）、武当玉兰（*M. sprengeri* Pamp.）、紫玉兰（*M. liliflora* Desr.）、山玉兰（*M. delavayi* Franch.）、桂南木莲（*M. chingii* Dandy）、红花木莲［*M. insignis*（Wall.）Bl.］、鹅掌楸［*Liriodenron chinense*（Hemsl.）Sarg.］。

（2）仪器 Gene Amp PCR System 2400（Perkin Elmer Corporation），Ultraspec 2000UV/Visible Spec-trophotometer（Phannacia Biotech）等。

（3）试剂 十六烷基三甲基溴化铵（CTAB），β-巯基乙醇，标准分子量 λDNA/*Hind* Ⅲ，λDNA/*Eco*R Ⅰ + *Hind* Ⅲ DNA Ladder（21227bp、5148bp、4973bp、4268bp、3530bp、2027bp、1904bp、1584bp、1375bp、947bp、831bp、564bp、125bp）等。

（4）方法

① DNA 的提取与纯化 从每种样本的 3 个个体中共取新鲜叶片 1g，置于灭菌的研钵中，加液氮迅速研磨成粉末，分装于 4 个 1.5mL 的 Eppendorf 管中，每管中加入 1mL－20℃预冷的丙酮，快速上下颠倒 6～7s，离心 10min（8000r/min），弃上清液，重复一次。每管加入 60℃预热的 2%CTAB 提取液 1mL，充分混匀，60℃水浴 4h，其间每隔 0.5h 上下翻动浮板一次。0℃预冷 500μL 氯仿-异戊醇（24：1）抽提 10min，离心 10min（15000r/min），取上清液，重复一次。取上层水相加入 2/3 体积 4℃预冷异丙醇，轻轻混合，置－20℃静置沉淀过夜。离心 5min（5000r/min），可见管底有半透明沉淀，弃上清液，取沉淀。每管加入 80μL 70%4℃预冷乙醇，并且在 0℃冰盒中上下颠倒漂洗 20min，离心 10min（3000r/min），弃上清液，重复一次。取沉淀于干净的 0.5mL Eppendoxf 管中，开管盖置干燥器中干燥 1h。50μL TE（pH8.0）溶解沉淀。

采用 Glass-milk Kit 纯化 DNA，50μL DNA 溶液中加入 3 倍体积的溶胶液，混匀。加入 10μL 玻璃奶，混匀，室温静置 5min。离心（8000r/min）数秒，吸弃上清液。加 125μL 漂洗液，用加样器吸漂洗液将玻璃奶冲散均匀，离心弃上清液，重复两次。加入 TE（pH8.0）20μL，混匀，60℃水浴 5min，离心（15000r/min）数秒，回收上清液，重复一次，可得纯化后 DNA 溶液 40μL。

② DNA 定性定量检测　DNA 分子量：取 7μL DNA 溶液与 3μL 溴酚蓝溶液混匀，点样于 1.4%琼脂糖凝胶（加溴化乙锭至 1.0μg/mL）上，5V/cm 电泳 1h，254nm 紫外灯下观察。DNA 分子量与 λDNA/*Hin*dflⅢ标记物比较。

DNA 溶液纯度及浓度：5μL DNA 溶液加双蒸水至 100μL，稀释 20 倍，置石英比色皿中，在波长 260nm、280nm 及 320nm 处测定吸光度值，根据$(A_{260}-A_{320})/(A_{280}-A_{320})$比值判断 DNA 样品纯度，由 $A_{260}-A_{320}$ 的值估算其浓度$[(A_{260}-A_{320})\times 50\mu g/mL]$，DNA 模板的得率按：浓度×20×50$\mu$L/(1×1000)计算，单位 ng/mg（DNA 模板溶解于 50μL TE 溶液中，测量时稀释 20 倍，每个样本材料总共 1g）。具体数据见表 7-12。

③ DNA 扩增　反应体系总体积为 25μL，其中引物 1.5μmol/L，模板 DNA 25ng/μL，dNTP 每种各 200μmol/L，$MgCl_2$ 2.5mmol/L，10 × buffer（10mmol/L KCl，10mmol/L Tris-HCl，0.1% Triton X-100，pH8.3）2.5μL，1.0U Taq DNA 聚合酶。每组反应均设不含模板 DNA 的空白对照。扩增程序为：95℃ 3min20s 预变性，随后进行 40 个循环：94℃ 1min，36℃ 1min，72℃ 2min，最后 72℃10min 完全延伸一个循环。

④ PCR 扩增产物检测　RAPD 扩增产物使用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测，将 25μL 扩增产物与 5μL 溴酚蓝混匀后点样，并在样品一侧点入 λDNA/*Eco*RⅠ+*Hin*dⅢ DNA Ladder 5μL，5V/cm 电泳约 60min，紫外灯（254nm）下观察并拍照。

⑤ 数据分析　任意两个样本间的相似系数（F）根据 $F=2N_{XY}/(N_X+N_Y)$ 公式计算，其中 N_X、N_Y 分别是样本 X、样本 Y 扩增出的 DNA 片段总数，N_{XY} 是样本 X 和样本 Y 共有的 DNA 片段数。进一步计算出任意两个样本间 1-F 遗传距离系数，并通过 UPGMA 法聚类，构建树系图。

（5）结果见表 7-12、表 7-13、表 7-14、图 7-21。

表 7-12　10 种植物基因组 DNA 的定性定量数据

编号及样品	A_{260}	A_{280}	A_{320}	纯度	浓度/ng・μL^{-1}	得率/ng・mg^{-1}
1. 厚朴	1.184	0.679	0.102	1.875	54	54
2. 凹叶厚朴	1.167	0.950	0.158	1.915	76	76
3. 玉兰	3.287	2.014	0.429	1.803	143	143
4. 望春玉兰	2.725	1.562	0.207	1.858	126	126
5. 武当玉兰	2.342	1.245	0.045	1.914	115	115
6. 紫玉兰	1.150	0.616	0.037	1.922	56	56
7. 山玉兰	2.149	1.159	0.099	1.934	102	102
8. 桂南木莲	1.592	0.891	0.121	1.910	74	74
9. 红花木莲	0.953	0.561	0.087	1.827	43	43
10. 鹅掌楸	1.700	0.912	0.122	1.997	79	79

表 7-13　由 RAPD 数据推导得到厚朴与其他样品的相似度指数

项目		相似度指数								
		$I_{VS}2$	$I_{VS}3$	$I_{VS}4$	$I_{VS}5$	$I_{VS}6$	$I_{VS}7$	$I_{VS}8$	$I_{VS}9$	$I_{VS}10$
引物	S30	0.89	0.55	0.55	0.60	0.50	0.75	0.40	0.29	0.25
	S36	0.83	0.67	0.55	0.60	0.60	0.80	0.40	0.33	0.36
	S61	0.94	0.52	0.64	0.58	0.70	0.72	0.64	0.86	0.56
	S64	0.78	0.76	0.70	0.56	0.74	0.84	0.64	0.66	0.52
	S66	0.90	0.54	0.72	0.66	0.72	0.54	0.38	0.44	0.40
	S80	0.82	0.47	0.59	0.71	0.56	0.56	0.38	0.40	0.33
	S91	0.78	0.58	0.72	0.76	0.62	0.58	0.62	0.62	0.32
	S92	0.66	0.44	0.18	0.16	0.22	0.36	0.40	0.30	0.0
	S96	0.76	0.64	0.50	0.58	0.54	0.50	0.44	0.64	0.48
	S97	1.0	0.72	0.80	0.60	0.66	0.42	0.54	0.46	0.30
	S99	0.75	0.57	0.50	0.44	0.25	0.73	0.44	0.40	0.40
	S155	0.88	0.50	0.50	0.55	0.32	0.55	0.30	0.27	0.27
	S156	0.80	0.50	0.50	0.50	0.50	0.29	0.50	0.33	0.0
	S501	1.0	0.60	0.66	0.66	0.72	0.72	0.76	0.66	0.34
	S504	1.0	0.50	0.66	0.54	0.66	0.60	0.30	0.44	0.0
	S505	0.83	0.64	0.48	0.52	0.56	0.71	0.32	0.32	0.33
	S509	0.89	0.66	0.53	0.63	0.48	0.64	0.50	0.44	0.25
	S512	0.76	0.59	0.59	0.66	0.55	0.59	0.50	0.52	0.32
	S517	0.73	0.69	0.40	0.44	0.43	0.57	0.40	0.38	0.31
	S519	1.0	0.50	0.57	0.44	0.44	0.50	0.33	0.29	0.0
相似度指数平均值		0.85	0.58	0.57	0.56	0.54	0.60	0.46	0.45	0.29

注：样品编号与表 7-12 相同。

表 7-14　任意 2 个个体间的 1-F 距离系数（左下）RAFD 图谱中共有的片段数和扩增片段总数（右上）

样品	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
01		125/291	82/281	81/284	84/298	81/300	90/300	66/290	67/295	41/278
02	0.15		72/272	75/276	84/285	86/289	88/290	67/278	67/283	30/271
03	0.42	0.47		114/286	103/294	105/291	81/289	75/293	67/298	45/275
04	0.43	0.46	0.20		110/297	111/302	88/298	80/289	77/290	41/277
05	0.44	0.41	0.30	0.26		105/305	86/301	77/292	77/298	46/280
06	0.46	0.42	0.28	0.27	0.31		79/297	78/286	69/292	35/273
07	0.40	0.39	0.44	0.41	0.43	0.47		76/290	73/294	42/278
08	0.54	0.52	0.49	0.45	0.47	0.46	0.48		83/298	43/281
09	0.55	0.53	0.55	0.47	0.48	0.53	0.50	0.44		42/283
10	0.71	0.78	0.67	0.70	0.67	0.75	0.70	0.70	0.70	

注：表中样品编号与表 7-12 相同。

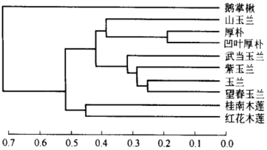


图 7-21 厚朴 RAPD 数据，使用 1-F 距离系数、UP-GMA 法聚类分析产生的树状图

【附】 随机扩增多态性 DNA 扩增，共获得可区分的 DNA 扩增片段 1429 条，其中多态性片段 1169 条，占总数的 81.81%。

结果显示：山玉兰与厚朴的 1-F 遗传距离系数为 0.60，而且与厚朴、凹叶厚朴聚为一个分支，证明它与厚朴的亲缘关系较密切。

11. 蛇胆

【来源】 本品为眼镜蛇科动物眼镜蛇［*Naja naja*（Linnaeus)］、金环蛇［*Bungarus fasciatus*（Schneider)］、银环蛇（*Bungarus multicintus* Blyth），游蛇科（Colubridae）动物灰鼠蛇［*Ptyas korros*（Schleger)］、乌梢蛇［*Zaocys dhumnades*（Cantor)］或其他种类蛇的胆。

【DNA 鉴别】

（1）材料　蛇胆鲜品和干品、白酒浸泡蛇胆的胆衣和胆汁，家鸭（*Anas platyrhynchos domestica*）的胆，乌梢蛇［*Zaocys dhumnades*（Cantor)］的冻存肌肉组织（作为 DNA 提取、扩增对照），棕黑锦蛇（*Elaphe schrenckii* Strauch）的冻存肌肉和胆汁（表 7-15）。

表 7-15　实验材料

样　品	产　地	条　件	材　料	序　号
蛇胆囊	福建,福州	2 干燥	胆衣、胆汁	F1-y,F2-y F1-z,F2-z
蛇胆囊	无锡,江苏	2 干燥	胆衣、胆汁	W1-y,W2-y W1-z,W2-z
蛇胆囊	苏州,江苏	2 浸在白酒中	胆衣,胆汁	S1-y,S2-y S1-z,S2-z
乌梢蛇	祁门,安徽	1 冷冻	肌肉	W-j
棕黑锦蛇	连云港,江苏	1 冷冻	肌肉,胆汁	Z-j,Z-z
鸭胆囊	南京,江苏	1 新鲜	胆衣,胆汁	Y-y,Y-z

（2）仪器　PTC-200 型基因扩增仪等。

（3）方法

① DNA的提取　干蛇胆用双蒸水浸泡6h，其间更换水数次，使其软化并洗去表面污染物；白酒浸泡蛇胆，用流水浸泡1天，以除去酒精及表面污染物；鸭胆、蛇胆用双蒸水冲洗干净。用一次性无菌注射器抽取胆汁或剪破胆衣收集胆汁，然后将胆衣和胆汁分别转入5mL离心管中，加入裂解液（含Tris-HCl 0.01mol/L pH8.0，EDTA 0.1mol/L，NaCl 0.1mol/L）2.0mL；1/10体积的100g/L SDS和蛋白酶K（终浓度100μg/mL）混匀，56℃水浴中保温8～10h，其间轻摇数次，至样品完全消化。消化液用等体积饱和酚抽提1次，等体积酚-氯仿抽提两次，氯仿-异戊醇（24：1）抽提1次，加1/10体积的3mol/L NaAc和2.1倍体积无水乙醇沉淀DNA，置－20℃冰箱中2h，12000r/min离心20min，沉淀物用70%乙醇洗涤2次，置室温晾干后加入适量TE溶解DXA，4℃保存备用。冻存肌肉组织DNA提取方法参照前文。

② PCR扩增　所用引物为特异性扩增约400bp长的线粒体12S rRNA基因片段的通用引物L1091（5′-AAAAAGCTTCAAACTGGGATTAGATACCCCACTA-3′）和H1478（5′-TGACTGCAGAGGGTGACGGGCGGTGTGT-3′），双蒸水配制成10pmol/L的溶液待用。

PCR反应体积30μL，含10mol/L Tris-HCl（pH8.0），50mol/L KCl，0.1% TritonX-100，1.5mmol/L $MgCl_2$，2.0mol/L dNTP，引物L1091、H1478各10pmol/L，1U Taq酶和模板DNA约100～150ng。扩增反应在基因扩增仪上进行，95℃预变性4min，然后95℃ 40s变性，58℃ 30s复性，72℃ 1min延伸，完成35个循环后，72℃ 5min补齐。

取扩增产物4μL，经1.0%琼脂糖凝胶电泳，EB染色拍照。

③ PCR产物的纯化及测序　分别选取1枚干蛇胆的胆衣和胆汁（F2-y，F2-z）和1枚白酒浸泡蛇胆的胆衣和胆汁（S2-y，S2-z）及原动物棕黑锦蛇的冻存肌肉和胆汁（Z-j，Z-z）的扩增产物，用1.0%琼脂糖凝胶电泳分离目的片段，再用柱离心式胶回收试剂盒回收。纯化后的PCR产物用BigDye™测序试剂盒和ABI 310全自动测序仪测序。

（4）结果　见图7-22、图7-23。

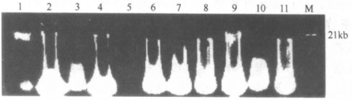
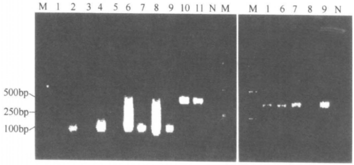


图7-22　蛇胆等琼脂糖凝胶电泳

1～11—W-j，W1-y，W1-z，W2-y，W2-z，F1-y，F1-z，S1-y，S1-z，Y-y，Y-z；

M—marker（λDNA/*Eco*RⅠ＋*Hin*dⅢ digested）



(a) 12S rRNA基因片段　　(b) 纯化DNA

图 7-23　PCR 产物 50ns 电泳图谱

1～11—W-j，W1-y，W1-z，W2-y，W2-z，F1-y，F1-z，S1-y，S1-z，Y-y，Y-z；

N—阴性对照；M—marker（DL 2000）

【附】 除W2-z 外，所有样品的 DNA 提取液经电泳检测，均能检测到 DNA。而对 W2-z 样品进行 PCR 反应时得到了扩增条带，说明在作模板 DNA 电泳检测时该样品点样量不足。与冻存肌肉中所提的 DNA 相比较，从干蛇胆和白酒浸泡蛇胆的胆衣和胆汁中所提的 DNA 降解程度较大。鸭胆的降解程度较大与收集样本之前较长时间于室温保存有关。

12S rRNA 基因片段的序列分析结果表明：Z-j 和 Z-z 的 12S rRNA 基因片段碱基排列顺序完全一致；F2-y 和 F2-z、S2-y 和 S2-z 的碱基排列顺序完全一致，经 GebBank 中 BLAST 分析后表明：本研究的干蛇胆为网斑蟒（*Python reticulatus*）的胆，白酒浸泡的胆则为桓仁林蛙（*Rana huanrenensis*）的胆。

12. 玉竹

【来源】 本品为百合科植物玉竹［*Polygonatum odoratum*（Mill.）Druce］的干燥根茎。

【RAPD 鉴别】

（1）材料　材料均为嫩叶，经硅胶快速干燥保存。①玉竹（湖南新邵潭溪镇）；②玉竹（广东中医药大学药园）；③多花黄精（*P. cyrtonema*）（湖南中医学院药学分院药园）；④狭叶黄精（*P. stenophyllum*）（湖南中医学院药学分院药园）；⑤玉竹（北京海淀区西北旺）。

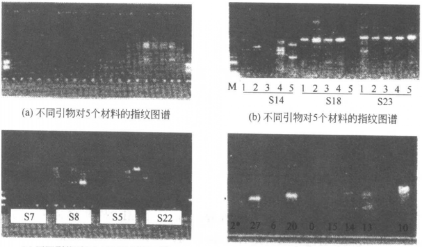
（2）仪器　PCR 热循仪（由 WJ. Research Inc. TaqDNA 生产）。

（3）试剂　dNTP，聚合酶，$MgCl_2$（均购自 Sangon 公司）；矿物油（购自 Sigma 公司）；λDNA/*Eco*RⅠ＋*Hind*Ⅲ（BioLabs 公司）；聚乙烯吡咯烷酮；溴化乙锭。

（4）方法　基因组 DNA 的提取与纯化　按刘春林介绍的方法和《植物遗传手册》植物基因组总 DNA 的提取方法，操作如下：取嫩叶 0.5～1g，于液氮中

快速研磨成细粉，并加入适量 PVP（聚乙烯吡咯烷酮）和 3～4mL DNA 提取缓冲液 [100mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 100mmol/L EDTA (pH8.0), 250mmol/L NaCl, 1%SDS]，分别将研磨液 0.5mL 转入不同的 1.5mL 灭菌离心管中。加入等体积的苯酚-氯仿-异戊醇（25：24：1）溶液充分混匀。离心（4℃，13000r/min）。

（5）结果　见图 7-24、表 7-16、图 7-25。



(a) 不同引物对5个材料的指纹图谱　(b) 不同引物对5个材料的指纹图谱

(c) 不同引物对5个材料的指纹图谱　(d) 引物筛选的结果

图 7-24　不同引物对供试材料的部分指纹图谱和引物筛选结果

M—marker (λDNA/*Eco*R Ⅰ + *Hind* Ⅲ)；

1—湖南玉竹；2—广东玉竹；3—北京玉竹；4—多花黄精；5—狭叶黄精

表 7-16　基于 RAPD 标记的供试材料的相似性系数

材料	1	2	3	4	5
湖南玉竹	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
广东玉竹	0.5893	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
多花黄精	0.2574	0.1980	0.3962	0.0000	0.0000
狭叶黄精	0.6387	0.7732	0.3548	0.2037	0.0000
北京玉竹	0.4273	0.2393	0.0000	0.0000	0.0000

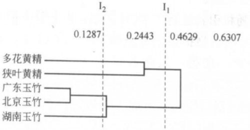


图 7-25　RAPD 聚类图结果

【附】 实验从 Sangon 46 个随机引物中筛选出有效引物 17 个，对供试的 5 个材料共扩增出 136 条谱带，其中多态带有 131 条，占扩增总带数 RAPD 多态性 96.3%，每条引物扩增的带数除 S7 号引物只有 1 条外，其他的均在 5～12 之间，平均为 8 条，其中扩增带数最多的为 S52 号引物，具 12 条扩增带。在扩增出的 136 条谱带中，有 5 条为全部供试材料所共有。

13. 木蓝属植物药

【来源】 本品为木兰科木蓝属多种植物药。

【RAPD 鉴别】

（1）材料　木蓝属植物（见表 7-17）。实验材料取地上部分，晒干备用。

表 7-17　实验材料

编号	名　称	产地	编号	名　称	产地
1	蒙自木蓝 *Indigofera mentzeana* Craib	蒙自	5	小苦参(敏感木蓝)*I. sensitiva* Franch.	大理
2	鸡眼草 *I. striata*	昆明	6	野青树 *I. suffruticosa* Mill.	景洪
3	苍蝇草(绢毛木蓝)*I. hancockii* Craib	昆明	7	尾叶木蓝 *I. caudata* Dunn	景洪
4	山皮条(四川木蓝)*I. szechecenensis* Craib	昆明	8	昆明木蓝 *I. mairei*	昆明

（2）方法

① DNA 的提取　取 1g 材料研碎，加入 20mL 提取缓冲液（8mmol/L Urea，0.4mol/L NaCl，0.05mol/L Tris-HCl，pH8.0，0.02mol/L EDTA，2% sarcosyl，5%Phenol）于 60℃保温 30min，用等体积的氯仿萃取后，上清液再用等体积的苯酚-氯仿-异戊醇（25∶24∶1）抽提 1 次，用无水乙醇沉淀后将沉淀的 DNA 离心分离，再用 70%乙醇洗 2 遍，干燥，溶于适量 TE 中，冰冻保存。

② RAPD 反应　扩增总体积 25μL，其中含 10mmol/L Tris-HCl（pH8.3），2.0mmol/L $MgCl_2$，dATP，dCTP，dTTP，dGTP 各 0.1mmol/L，引物为 0.2μmol/L，50ng 核 DNA，2 单位的 Taq 酶。整个扩增程序为：94℃，1min；36℃，1min；72℃，2min；经 40 个循环后，再在 72℃延伸 5min。扩增产物在 1.4%的琼脂糖凝胶中电泳，经 EB 染色，紫外灯下观察结果，照相。

（3）结果　见图 7-26。

【附】 对50 个随机引物进行了 PCR 扩增，8 个引物扩增成功。有些扩增结果不显多态性，而有些引物扩增结果表明种间差异明显，如 β-08（见图 7-26）。山皮条在 0.6kb 处有一条带，尾叶木蓝有一 0.9kb 的带，而小苦参在 0.6～0.9kb 间有一条带。鸡眼草在 0.6～0.9kb 间有 4 条带，而蒙自木蓝在 0.6～0.9kb 间有 3 条带相区别，昆明木蓝的 3 条带则存在于 0.9～1.5kb 间。苍蝇草和野青树在 0.9～0.6kb 间都有两条带，前者有 1 条带接近 0.6kb，后者有 1 条带接近 0.9kb，两者的另 1 条带相近。

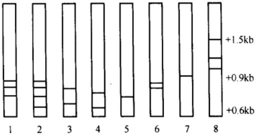


图 7-26　8 种木蓝属药的 β-08 引物扩增的 DNA 指纹图谱

1—蒙自木蓝；2—鸡眼草；3—苍蝇草；4—山皮条；5—小苦参；
6—野育树；7—尾时木蓝；8—昆明木蓝

14. 蓼大青叶

【来源】 本品为蓼科植物蓼蓝（*Polygonum tinctorium* Ait.）的干燥叶。

【nrDNA ITS 区序列鉴别】

（1）仪器　DNeasy^{TM} PLant Mini Kit（QIAGEN，德国）。

（2）试剂　标准物 1kb ladder；λDNA *Hin*d Ⅲ digest 等。

（3）方法

① DNA 的提取　蓼大青叶干燥药材 50mg、水蓼干叶片 50mg 和新鲜叶片 200mg，分别用蒸馏水和 70% 乙醇轻拭叶表，液氮研磨成细粉后，使用 DNeasy^{TM} PLant Mini Kit（QIAGEN，德国），按其规定操作顺序进行 DNA 的提取。

② 总 DNA 的分子量测定　上述所获得的两种植物共计三种样品的总 DNA，各取 5μL 在 1% 琼脂糖凝胶中电泳测定其分子量。标准物用 1kb ladder 和 λDNA *Hin*d Ⅲ digest（图 7-27）。

③ ITS 区片段的 PCR 扩增　ITS（包括 ITS1、5.8S、ITS2）的扩增参照 Takaiw 等的引物，设计为：P18S 3′：5′-CGT，AAC，AAG，GTT，TCC，GTA，GGT，GAA，G-3′ P26 S 5′：5′-TTA，TTG，ATA，TGC，TTA，AAC，TCA，GCG，GG-3，以上引物所扩增的片段理论上为 3′-18S-ITS-5′-26S（包括 5.8S 编码区）．PCR 反应体系为：10×PCR buffer 3μL；dNTP 2.5μL；$MgCl_2$（25mmol/L）1.8μL；Primer 1（10pmol/μL）1μL；Primer 2（10pmol/μL）1μL；Taq DNA 聚合酶（5U/μL）2μL；Template 约 70～80ng；ddH_2O 加至终体积 30μL。

PCR 循环条件 94℃预变性 4min；94℃变性 40sec；54℃退火 50sec；721℃延伸 2min；共 31 个循环，循环完成后，72℃保温 5min，反应结束；产物置 4℃保存。

④ PCR 产物的纯化　经 PCR 法获得的目的基因的 PCK 产物，用 Wiz-

zard^{TM} PCR Preps DNA Purification System（Promega，美国）进行纯化后，用于碱基序列测定。

⑤ 测序反应　将纯化后的 PCR 产物作为测序反应的模板，所用引物仍为 P18S 3′（引物 1）和 P26S 5′（引物 2）。

测序反应体系：Mix（试剂盒）1μL；Buffer（试剂盒）1.5μL DNA（PCK 产物）0.8μL（15～45ng）；Primerl 或 21.6μL；ddH_2O 加至终体积 10μL。

测序反应条件：95℃预变性 2min。96℃变性 10s，50℃复性 5s，60℃延伸 4min，共 35 个循环。反应结束，置 4℃下保存。

⑥ 测序反应产物的纯化　取出反应管，分别加入 95%乙醇 25μL 和 3mol/L 醋酸钠 1μL。混匀后在 4℃冰箱中放置 10min；离心 20min（14000r/min），取出上清液并弃之，向反应管中再加入 70%乙醇 130μL。混匀后放置 5min，离心 10min（14000r/min），取出样品管。小心吸取上清液并弃之；打开离心管盖，在 60℃恒温箱中烘 15min。

⑦ 进样测序　每个样品加 12μL TSR（template suppression reagent）液溶解沉淀物，混匀。在 Mastercycler gradient 上 95℃变性 2min，立即置于冰水中。将样品全部移入全自动测序专用管中，离心。毛细管电泳之后，序列资料直接从该测定仪上得到。

（4）结果　见图 7-27、图 7-28。

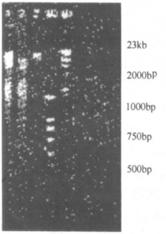


图 7-27　总 DNA 的电泳图谱

1—蓼蓝；2，3—水蓼［*Polygonum hydropiper*（Linn.）Spach］；
M1—λDNA*Hind*Ⅲ digest；
M2—1kb ladder

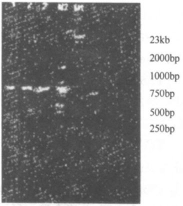


图 7-28　样品总 DNA ITS 区段的 PCR 产物琼脂糖电泳图谱

1—蓼蓝；2，3—水蓼［*Polygonum hydropiper*（Linn.）Spach］；
M1—λDNA *Hind*Ⅲ digest；
M2—1kb ladder

【附】 蓼蓝、水蓼的核糖体 DNA 内转录间隔区 ITS1 和 ITS2 与 3 个编码区 18S、5.8S、26S 的界限是根据登录在 GenBank 中的有关蓼科植物的 nrDNA 序列（ACCESSION No.：U51276，U51275，U51274，U51273）确定的，对其 ITS 区序列进行分析比较后显示，ITS 区分化较活跃，该片段对蓼属种间有很好的分辨率；而 5.8S 编码区高度保守。其长度完全一致，均为 164bP，且无变异位点。

15. 人参

【来源】 本品为五加科植物人参（*Panax ginseng* C. A. Mey.）的干燥根。

【RAPD 鉴别】

取本品（硅胶干燥）适量，用 2×CTAB 提取液提取总 DNA 作为反应模板。DNA 提取后进行去 RNA 纯化，即将总 DNA 用 1%的 RNaseA 酶解，等体积氯仿-异戊醇（24：1）抽提，用无水乙醇沉淀后溶于 0.1×TE 中，并用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度，电极缓冲液用 1×TAE。同法制备易混药材西洋参（*Radix Panacis Quinquefolii*）DNA 反应模板作为对比。分别取上述模板和相同引物（OPO 04：AAGTCCGCTC；OPF 02：GAGGTACCCT），加入 PCR 的反应体系 10μL 的反应液内含：模板约 1ng、引物 1mol/L、dNTP 各 200mol/L、DNA 聚合酶（Taq）0.5U、Ficoll 1%、酒石黄 1mmol/L。用 Idaho 1605 型毛细管气浴式 PCR 仪进行扩增反应：94℃变性 1min，35℃复性 10s，72℃延伸 1min，此程序 2 个循环后，接第 2 个程序 45 个循环（94℃变性 2s，35℃复性 10s，72℃延伸 1min），循环结束后 72℃补齐 4min，置 4℃保存。在 1.4%的琼脂糖凝胶中电泳，溴化乙锭（EB）染色，置紫外光灯（365nm）下观察。用引物 OPO 04 扩增的 RAPD 指纹：人参有 2 条谱带，西洋参有 790bp、630bp、590bp、370bp 4 条谱带；用引物 OPF 02 扩增的 RAPD 指纹：人参与西洋参有 4 条共同谱带，西洋参有 1 条分子量为 600bp 的特征性谱带。

16. 金银花

【来源】 本品为忍冬科植物忍冬（*Lonicera japonica* Thunb.）的花蕾。

【RAPD 鉴别】

（1）材料 山东平邑县栽培金银花品系的大毛花金银花和鸡爪花金银花。

（2）方法

① DNA 的提取 取各样品嫩叶 50mg，置研钵中，加液氮少许研磨成匀浆状，移入 Eppendorf 管中，再加入 100mL 预热至 60℃的 CTAB 提取缓冲液（2% CTAB，1.4mol/L NaCl，0.2%巯基乙醇，20mmol/L EDTA，100mmol/L Tris，pH8.0），于 60℃保温 30min，用等体积的氯仿-异戊醇（29：1）提取两次，离心 10min（9000r/min），将水相移入离心管中，加入 2/3 体积的冷异丙醇混匀，离心 6min（4000r/min），弃去上清液，于 0.6mL 洗缓冲液（70%乙醇，

10mmol/L 乙酸钠）悬浮，离心 10min（9000r/min），弃去上清液，沉淀置冰箱中冷冻干燥后，用 50μL TE 液悬液，加 1/10 体积的乙酸钠溶液（pH5.2），95%乙醇沉淀 DNA，1400r/min 离心 5min，弃去上清液，用 70%乙醇洗沉淀，净化台上自然干燥，用超纯水溶解后，置一20℃冰箱中保存备用。



图 7-29 金银花三个引物的扩增图谱
1，3，5—大毛花金银花；2，4，6—鸡爪花金银花（引物：1，2—OPJ14；3，4—OPJ16；5，6—OPJ20）

② PCR 反应条件与电泳分析 扩增反应液总体积 15μL，其中含缓冲液（buffer）1.5μL，3mmol/L $MgCl_2$ 1.5μL，4 种核苷酸（dATP、dGTP、dTTP、dCTP）各 250μmol/L，随机引物 15ng，样品 DNA 50mg，Taq DNA 聚合酶 1U。反应程序如下：95℃变性 5min，35℃退火 2min，72℃延伸 3min；后 44 个循环于 94℃ 10s，38℃ 10s，72℃ 50s，最后于 72℃保温 5min，25℃退火 5s。取扩增产物 7～12μL 在 1×TBE 缓冲液 1%琼脂糖凝胶中上样，电泳 3～4h，溴化乙锭染色，紫外灯下观察和照相。

（3）结果 见图 7-29。

【附】 RAPD 标记的随机引物及序列为：OPJ14-CACC CGGATG；OPJ16-CTGCTTAGGG；OPJ20-AAGCGGCCTC。扩增结果：大毛花金银花共扩增 DNA 谱带 24 条（OPJ14 扩增 DNA 谱带 9 条、OPJ16 扩增 DNA 谱带 9 条、OPJ20 扩增 DNA 谱带 6 条）；鸡爪花金银花共扩增 DNA 谱带 26 条（OPJ14 扩增 DNA 谱带 8 条、OPJ16 扩增 DNA 谱带 11 条、OPJ20 扩增 DNA 谱带 7 条）。

17. 溪黄草

【来源】 本品为唇形科植物溪黄草［*Rabdosia serra*（Maxim.）Hara］的全草。

【RAPD 鉴别】

（1）材料 1号：溪黄草；2 号：线纹香茶菜［*I. lophanthoides*（Buch.-Ham. ex D. Don）Hara］；3 号：细花线纹香茶菜（*I. lophanthoides* var. *graciliflora*）；4 号：狭基线纹香茶菜（*I. lophanthoides* var. *graciliflora*）；5 号：狭基线纹香茶菜（*I. lophanthoides* var. *graciliflora*）。取各样品幼嫩叶片。

（2）方法

① 模板 DNA 提取 采用 CTAB 法提取总 DNA，用 DPS 纯化系统（包括玻璃粉 NAI 备）纯化。

② RAPD 反应　总体积 15μL，其中含 2.0mmol/L $MgCl_2$；100μmol/L 的 dATP、dCTP、dGTP、dTTP；Operon 公司指定的引物浓度（加 1/10 反应体积的引物）；10～15ng 总 DNA；1U Taq 酶。扩增程序为：94℃，5min，1 个循环；94℃，1min；35℃，1min；72℃，2min，45 个循环；最后 72℃ 延伸 7min。扩增产物在 1.4% 的琼脂糖凝胶中电泳，经 EB 染色，紫外灯下观察结果，照相。扩增产物长度与分子量标记物（marker DNA）比较得出。

③ 结果　见图 7-30、图 7-31、图 7-32。

【附】　一定反应条件下，模板 DNA 量在一定范围内（约 15μL 中 10～20ng）反应体积，都可扩增出稳定且清晰的带型，当 DNA 用量过少或过多时，扩增产物减少，表现出带的数目减少，带的亮度减弱。Taq 酶用量少（0.3U/15μL）时，扩增产物带的数目有所减少，而 15μL 中 0.7～1.2U 均能取得良好效果。

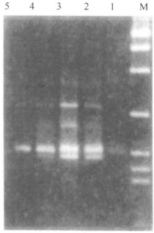


图 7-30　模板 DNA 用量对 RAPD 扩增的影响

1～5—不同体积的溪黄草 DNA，分别为 0.1μL、0.3μL、0.6μL、0.8μL、1.0μL；M—2kb marker（DNA 分子带长度自上而下为 3681bp、2799bp、1972bp、1167bp、711bp、672bp、594bp）。

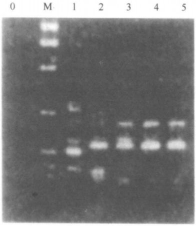


图 7-31　引物 C-02 扩增的 DNA 指纹图谱

0—空白对照；1—溪黄草；2—线纹香茶菜；3—细花线纹香茶菜；4—狭基线纹香茶菜（种植）；5—狭基线纹香茶菜；M—marker

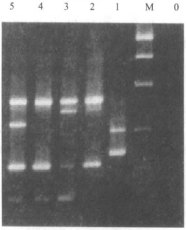


图 7-32　引物 D-20 扩增的 DNA 指纹图谱

0—空白对照；1—溪黄草；2—线纹香茶菜；3—细花线纹香茶菜；4—狭基线纹香茶菜（种植）；5—狭基线纹香茶菜；M—marker

品种间的 DNA 多态性分析：对 76 个 10mer 的寡核苷酸引物进行 PCR 扩增，共筛选出 14 个扩增产物重复性好的引物。不同引物扩增出的 DNA 片段从 4 个到 28 个不等，片段大小为 0.3～3kb。14 个有效引物共检出 194 个位点，其中品种特有位点 108 个，占 56.6%，品种特有位点可作为区别不同种的遗传标记。对溪黄草扩增出 6 条带；线纹香茶菜在 1167bp、638bp 处各有一条特异性带；细花线纹香茶菜较狭基线纹香茶菜多一条 920bp 带而相区别；不同产地的狭基线纹香茶菜的扩增产物完全一致。

18. 诃子

【来源】 本品为使君子科植物诃子（*Terminalia chebula Retz.*）的干燥果实。

【RAPD 鉴别】

（1）材料　见表 7-18。

表 7-18　样品来源

编号	样品	学　名	产地	纯度 A_{260}/A_{280}
1	绒毛诃子	*Terminalia chebula* Retz. var. *tomentella* Kurt.	云南	1.01
2	诃子	*T. chebula* Retz.	广东	1.05
3	小诃子	*T. chebula* Retz. f. *macrocarpa*	广东	1.05
4	恒河诃子	*T. chebula* Retz. var. *gangetica*(Robx.)C. B. Clarke	广西	1.04
5	银叶诃子	*T. argyrophylla* Pott. et Prain.	云南	1.03
6	大诃子	*T. chepula* Retz. f. *macrocarpa* nov. ined.	广东	1.06
7	毛诃子	*T. billerica*(Gaertn.)Roxb.	云南	1.08

（2）仪器　紫外-可见分光光度计（Pharm acia 4000），PCR 仪（PE 2400）等。

（3）方法

① DNA 提取　称取样品 0.3g，用玻璃砂研磨，采用改进的高盐低 pH 法获得总 DNA。

② DNA 扩增　反应总体积为 25μL。其成分为：$MgCl_2$ 2.5μL（25mmol/L），引物 2μL（5μmol/L），BSA 1μL（25g/L），4 种 dNTP 0.25μL（100mmol/L），10×buffer 缓冲液 2.5μL（无 Mg^{2+}），2.0U Taq 酶，25ng 样品。循环参数：先 94℃，变性 3min；然后 94℃，1min；39℃，45s；72℃，60s；35 个循环。最后 72℃，3min。

③ 扩增产物检测　取扩增产物 10μL 于 1.5%琼脂糖凝胶上用 1×TAE 电泳缓冲液电泳，用 EB 染色 30min 于凝胶成像仪上进行分析。

④ 数据分析　电泳图谱中每 1 条带代表 1 个引物结合位点，根据分子迁移率及其有无进行统计：有带计为 1，无带计为 0。任意两个样本间的遗传差异用遗传距离指数 *D* 衡量。

$$F=\frac{2N_{xy}}{N_x+N_y};\ D=1-F$$

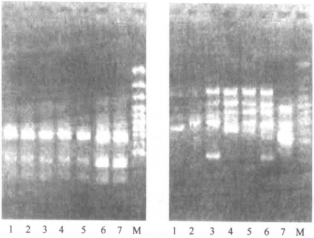
式中　F——共享度；

N_x，N_y——分别为第 x 个和第 y 个个体拥有的 RAPD 标记数；

N_{xy}——x 和 y 个个体共享的 RAPD 标记数。

采用 Phlip 软件包的 UPGMA 软件进行分析，建立种系发生图。

（4）结果　见图 7-33、表 7-19。



(a) 引物S345:CACCCGGATG　　(b) 引物S30:GTGATCGCAG

图 7-33　诃子等 DNA 指纹图谱

1—绒毛诃子（云南）；2—诃子（云南）；3—小诃子（广东）；4—恒河诃子（广西）；5—银叶诃子（云南）；6—大诃子（广东）；7—毛诃子（云南）；M—marker（200～3000bp）

表 7-19　样品 DNA 指纹图

引　物	序　列	引　物	序　列
S30	GTGATCGCAG	S359	GGACACCACT
S161	ACCTGGACAC	S429	TGCCGGCTTG
S207	GGCAGGCTGT	S443	CTGTTGCTAC
S208	AACGGCGACA	总数	8
S341	CCCGGCATAA		

【附】

① DNA 提取　核酸提取是核酸研究的第一步，中药材加工运输的过程中，均可能受到外源 DNA 的污染，因此，在取样之前，先将样品洗净，并用紫外照射 30min 以去除外源 DNA。取样时，最好选用核仁提取 DNA。经过反复提取，发现各种诃子的皮和壳均较难得到 DNA，而种仁 DNA 含量较为丰富。但需注意的是，仁含有较多油状物质，必须用氯仿-异戊醇（24：1）多抽提 1 次，另

外，各样品 DNA 的 TE 溶液都为不同程度的黄褐色，经纯化后也难以去除，在 PCR 反应中加入了 BSA（1.0g/L），使 PCR 反应得到了有效扩增。

② 反应介质　BSA 对 PCR 的扩增有一定影响。在龟板和鳖甲的 PCR 扩增中用各种方法甚至 PROM EGA 的纯化试剂盒均不能去除反应中的抑制物，但加入 BSA 后则获得了较好的扩增。

③ PCR 结果　能够产生清晰 DNA 指纹图的引物少，121 条引物仅筛选出 8 条，占 6.61%，根据这些引物可进行鉴别。8 条引物中有 1 条各样品指纹图基本一致［图 7-33（a）］，7 条能产生多态性［图 7-33（b）为其中一条］，低于我们在其他中药研究中的比率，说明各样品之间有着较近的亲缘关系。

19. 山药

【来源】 本品为薯蓣科植物薯蓣（*Dioscorea opposita* Thunb.）的块茎。

【DNA 鉴别】

（1）材料　山药，褐苞薯蓣（*D. persimilis* Prain et Burkill.）、日本薯蓣（*D. japonica* Thunb.）、参薯（*D. alata* L.）的块茎。

（2）仪器　ABI 377 型 DNA 自动测序仪（Applied Biosystems 公司）等。

（3）方法

① 引物设计　18S rRNA 基因 PCR 扩增的通用引物根据 Sogin 设计的序列合成。

18SF：5′-CAACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3′

18SR：5′-CTGATCCTTCTGCAGGTTCACCTAC-3′

由于 18S rRNA 基因长度为 1.8kb 左右，利用单个引物进行一次 PCR 测序反应无法测得此区段全部序列，因此还根据 White 等的设计合成了 3 对测序引物 18SF1 和 18SR1、18SF2 和 18SR2、18SF3 和 18SR3 进行双向测序。

② DNA 的制备　取 100～130mg 样品细粉加入 6 倍预热至 56℃ 的 2×CTAB 提取缓冲液，于 56℃ 水浴槽中保温反应 30min，加入等量氯仿-异戊醇（24∶1），离心 10min（14000r/min）。取上清液加 0.1 倍 10% CTAB 溶液，室温下放置 10min，再用氯仿-异戊醇提取 1 次。取上清液加等量 1×CTAB 沉淀缓冲液于室温下过夜，离心 30min（13000r/min）。倾去上清液，沉淀用 65% 和 85% 乙醇各洗两次，然后于 60℃ 烤箱中干燥 30min。加入 50μL TE 缓冲液溶解 DNA，存于 −20℃ 冰箱备用。

③ PCR 扩增反应　取 50～100ng DNA 作模板，加入 dNTP，0.25μmol/L 引物，1.5U Taq DNA 聚合酶，反应总体积为 50μL，置于 PCR 仪，先进行 94℃ 3min，然后按下列参数进行 35 个循环：94℃ 1min，60℃ 1min，72℃ 2min；最后 72℃ 30min。取 PCR 反应液 5μL 于 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳，EB 染色。

④ 测序反应　PCR 扩增产物经 QI Aquick Purification 试剂盒按其操作手册

进行纯化后直接用于测序循环反应。采用双脱氧末端终止法按 Thermo Sequenase 循环测序试剂盒实验指南进行测序。测序反应分 4 管，每管反应体积为 5.0μL，内含 3.0μL 纯化的 PCR 产物，0.2μL 测序引物（0.2pmol/L），1.8μL d/dd NTP 混合试剂，循环测序反应条件：95℃ 5min，1 个循环。95℃ 30s，50℃30s，70℃ 1min，40 个循环。测序反应结束后加 3μL 测序终止缓冲液，离心混匀。取 1μL 测序反应液上样于聚丙烯酰胺-7mmol/L 尿素凝胶电泳板，用测序仪进行测序。

⑤ 序列数据分析　所测单链序列经计算机阅读并人工校阅后，采用 Auto Assemble 程序进行 DNA 双向排序，并以手工适当调整以减少空位（gap）数目。排好的序列用 PAUP 软件进行 DNA 序列同源性比较。

（4）结果　见表 7-20、图 7-34、图 7-35。

表 7-20　山药等 18S rRNA 基因序列同源性（右上角）**和碱基变异位点数**（左下角）

序号	名称	1	2	3	4	5
1	山药 *Dioscorea opposita* Thunb.	—	100	99.89	97.51	94.40
2	山药 *D. persimilis* Prain et Burkill.	0	—	99.89	97.51	94.40
3	土山药 *D. japonica* Thunb.	2	2	—	97.51	94.40
4	方山药 *D. alata* L.	45	45	45	—	96.23
5	黄独 *D. bulbifera* L.	101	101	101	68	—

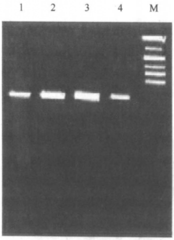


图 7-34　山药及其 3 种习用品 18S rRNA 基因 PCR 扩增图谱

1—山药；2—广山药；3—土山药；4—方山药；M—1kb ladder 分子标记物

【附】 采用 CTAB 微量提取法分离山药及其 3 种习用品总 DNA，无论新鲜叶片或干燥根茎药材均能得到 23.1kb 的 DNA，利用 18S rRNA 基因通用引物进行 PCR 扩增，获得预期 1.8kb 的双链产物。经过测序发现，4 种山药与习用品 18S rRNA 基因核苷酸序列中山药、广山药与土山药的长度相同；而方山药不

131　　140	181　　200	221　　250	1087	1186	1706　　1720	
ATGCCC-GTA	AAACCCCGACCTTTGGGAGG	GGTCGATGCGGGCTTTGCCCGTTGTACCGAT	C	G	GGGTGGTTCGCCACT	*Dloseorea pohstacitfa*
******_***	********************	******************************	*	*	***************	*D.persimills*
******_***	********************	******************************	T	A	***************	*D.japomca*
*****TG***	*TT*******T*****A***	**C*****************C**T**T***	T	*	*C***T*********	*D.alala*
*--**TG***	*TT*******TCCC**A***	**C***C*******CGT****CC**T**T***	T	*	**CG*T****CGT**	*D.huibrfera*

图 7-35　薯蓣及其近缘植物 18S rRNA 基因部分片段序列同源性比较

上方数字为自上游核苷酸位置；* 代表与薯蓣（*Dioscorea polystachya*）相同的碱基

同。根据排序比较，山药与广山药两者序列完全相同，同源性为 100%，而山药与土山药、方山药间的同源性分别为 99.89%和 97.51%。

20. 石斛

【来源】 本品为兰科植物美花石斛（*Dendrobium loddigesii* Rolfe.）和束花石斛（*D. chrysanthurn* Wall. ex Lindl.）的全草。

【RAPD 鉴别】

（1）方法

① 总 DNA 提取、纯度检测　取样品约 1g，加入 4mL 预冷的抽提缓冲液（0.05mol/L Tris-HCl，pH8.0；0.1mol/L EDTA，5%巯基乙醇，2% SDS），混匀，置 65℃水浴 20min，加入等体积氯仿-异戊醇（24∶1），混匀，离心 10min（8000r/min），吸取上清液，加入 RNA 酶 2μL，37℃保温 30min；再加入等体积的氯仿抽提 1 次，用预冷的异丙醇沉淀 DNA 于 4℃放置 30min，离心 10min（8000r/min），70%乙醇洗涤 DNA 沉淀两次，超净台上晾干 DNA，用 200μL TE 缓冲液溶解，置 4℃备用。用紫外分光光度计检测，计算 A_{260}/A_{280} 值，两种 DNA 样品纯度为 1.67 和 1.88。

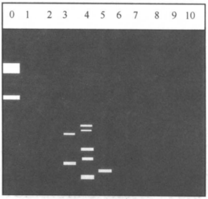


图 7-36　美花石斛和束花石斛 RAPD 电泳图谱

0—marker；1，3，5，7，9—1 号模板（美花石斛）；2，4，6，8，10—2 号模板（束花石斛）（引物：1，2 道—S4；3，4 道—S12；5，6 道—S31）

② RAPD 反应　反应总体积为 20μL（10mmol/L Tris-HCl，pH8.3；50mmol/L NaCl，0.001%明胶，2mmol/L $MgCl_2$，dNTP 100mmol/L，随机引物 2μmol/L，模板 20ng）。按下列循环参数进行 PCR 扩增（45 个循环）：94℃预变性 90s；94℃变性 40s；36℃复性 60s；72℃处延伸 120s；72℃保温 5min。

③ 扩增产物检测　取扩增产物 10μL，于 1.5%琼脂糖凝胶上用 1×TAE 电泳缓冲液电泳，用 EB 染色 30min 于凝胶成像仪上进行分析。

（2）结果　见图 7-36。

【附】 20 种随机引物 RAPD 反应预选后，采用 S4、S12、S31 三种引物为扩增引物，进行最终 RAPD 反应。结果发现：三种能扩增出多态性 DNA 的引物中，以 S12 扩增的差异性最好。

21. 三七

【来源】 本品为五加科植物三七［*Panax notoginseng*（Burk.）F. H.

Chen] 的根。

【DNA 鉴别】

(1) 材料　三七 (Pn)、竹节参 [*Panax japonicus* C. A. Mey. Hoo et Tseng (Pi)]、桂莪术 [(Ck) *Curcuma kwangsiensis* S. G. Lee et C. F. Liang]、蓬莪术 [(Cp) *Curcuma phaeocaulis* Val.]、温莪术 [(Cw) *Curcuma wenyujin* Y. H. Chen et C. Ling]。

(2) 仪器　PTC 100 型 PCR 仪，4000L 型 DNA 自动测序仪。

(3) 方法

① 总 DNA 制备　采用改进的 CTAB 微量提取方法制备总基因组 DNA。取 100～200mg 样品细粉加入 6 倍预热至 56℃的 2×CTAB 提取缓冲液中，于 56℃恒温振荡器中保温 30min，加入等量氯仿-异戊醇 (24：1)，离心 10min (14000r/min)。取上清液加 0.1 倍 10% CTAB 溶液，室温下放置 10min，再用氯仿-异戊醇提取一次。取上清液加等量 1×CTAB 沉淀缓冲液于室温下放置 30min，离心 15min (13000r/min)。倾去上清液，粗 DNA 沉淀用 65%和 85%乙醇各洗两次，然后于 60℃烤箱中干燥 30min。加入 50μL TE 缓冲液溶解 DNA，存在－20℃冰箱备用。

② PCR 扩增　18S rRNA 基因 PCR 通用引物据 Sogin 氏设计　18SF：5′-CAACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3′ 和 18SR：5′-CTGATCCTTCT-GCAG-GTTCACCTAC-3′。三七与竹节参 *matK* 基因扩增引物据大井氏设计合成，*matK*-AF：5′-CTATATCCACTTATCTTTCAGGAGT-3′ 和 *matK*8R：5′-AAAGTTCTAGCACAAGAAAGTCGA-3′。而莪术类此引物无法扩增，故引用 *trnK* 基因扩增，其通用引物根据 Johnson 和 Solitis 设计合成。*trnK*-3914E：5′-TGGGTTGCTAACTCAATGG-3′；*trnK*-2R：5′-AACTAGTCGGAT GGAG-TAG-3′。

取 50～100ng DNA 作模板，加入 dNTP 各 0.2mmol/L，0.25μmol/L 引物，1.5U Taq DNA 聚合酶及 1×Taq 缓冲液使最终反应体积为 50μL。18S rRNA 基因按下述循环反应参数进行扩增：94℃ 3min，65℃ 8min，1 个循环；94℃ 40s，65℃ 8min，30 个循环；72℃ 15min，1 个循环。*matK* 基因循环反应参数：94℃ 3min，1 个循环；94℃ 1min，45℃ 1min，72℃ 2min，35 个循环；72℃ 30min，1 个循环。*trnK* 循环反应参数：94℃ 3min，1 个循环；94℃ 1min，52℃ 1min，72℃ 2.5min，35 个循环；72℃ 110min，1 个循环。

③ 测序　由于 18S rRNA 基因和 *trnK* (含 *matK*) 基因长度分别达 1.8～2.7kb，利用单个引物进行一次 PCR 直接测序无法测得此区段全部序列，因此还分别设计合成了这 3 个基因 2～4 对荧光测序引物。将 PCR 扩增产物按纯化试剂盒操作手册进行纯化后直接用于测序循环反应。采用双脱氧末端终止法按测序试

剂盒实验指南进行测序。测序反应分 4 管，每管反应体积为 6.75μL，内含 5.0μL 纯化的 PCR 产物、0.25μL（0.25μmol/L）荧光测序引物、1.5pL ddNTP 混合试剂。循环测序反应条件：95℃ 5min，1 个循环；95℃ 30s，50℃ 30s，70℃ 1min，40 个循环。测序反应结束后加 4μL 终止缓冲液后离心混匀，取 1μL 测序反应液点样于 4%聚丙烯酰胺测序胶进行测序。

④ 数据分析　所测正反向单链序列经序列阅读软件 BaesI magiR（4.0 版本，LI-COR 公司）读序并人工校阅后，采用 Anto Asse mbler™ 程序（1.30 版本，美国 Applied Biosystems 公司）进行 DNA 双向排序，并以手工适当调整以减少空位（gap）数目。排好的序列采用 Gene-tyx-SV/R 软件（0.1 版本，日本 Software Development 公司）推导氨基酸序列和采用 PAUP 软件（4.0p 版本，美国 Sinauer Associates 公司）进行 DNA 序列变异位点比较和同源性分析。

（4）结果　见图 7-37、图 7-38、表 7-21。

```
225                      250 705            720 1595                 ·                 1733

ACGCGGGCTTCTGCCCGTTGCTGCGA GGCGATGCGCTCCTGT TGCGGCGACGTGGGGGGTTCGCTGCCTGCGACGTCGAAA Panax notoginseng(R1)
************************** ********T****** **************************C************ P.japonicus
*T*******C-*********TAC*** AAT******TG****G C*G**G****G***T*******CA*TC********TTG* Curucma phaeocaulis
*T*******C-*********TAC*** AAT******TG****G C*G**G****G***T*******CA*TC********TTG* C.wenyujin
*T*******C-*********TAC*** AAT******TG****G C*G**G****G***T*******CA*TC********TTG* C.hwangsiensis
```

图 7-37　三七等 18S rRNA 基因序列部分片段同源性比较

序列上方数字为自上游核苷酸位置；*代表与三七（*Panax notoginseng*）R1 序列相同的碱基；-代表排序空位

```
13  19  21  30  34  37  43  52  61                                      91  163 574 748 811 939 1174

ATC CAG GAG TAT GCA CTT CAT GGT ATA AAT AGA TGC ATT TTG TTG GAA AAT GCG  -  TTT AAC TTT TCC AAT GGA  Panax nataginseng(M1)
 I   Q   E   Y   A   L   H   G   I   N   R   S   I   L   L   E   N   A   -   F   N   F   S   N   R

ATC CAG GAG TAT GCA CTT CAT GGT ATA AAT AGA TGC ATT TTG TTG GAA AAT GCG  -  TTG AAT TTT TGA GAT GAA  P.japonicus
 I   Q   E   Y   A   L   H   G   I   N   R   S   I   L   L   E   N   A   -   L   N   F   S   H   O

GTC GAA GAA TAG GTA TTT TAT GGG AGT TCA ATT TTT TAT GAA GCC GAA AAC TCC TTG TTG AAT  -  TCG TAT TAG  Curucrna phaaocaulis
 L   Q   E   Y   V   F   Y   G   S   S   I   F   Y   E   P   Q   N   S   L   L   N   -   S   Y   R

GTC GAA GAA TAG GTA TTT TAT GGG AGT TCA ATT TTT TAT GAA GCC GAA AAC TCC TTG TTG AAT  -  TCG TAT TAG  C.wenyujin
 L   Q   E   Y   V   F   Y   G   S   S   I   F   Y   E   P   Q   N   S   L   L   N   -   S   Y   R

GTC GAA GAA TAG GTA TTT TAT GGG AGT TCA ATT TTT TAT GAA GCC GAA AAC TCC TTG TTG AAT  -  TCG TAT TAG  C.kwangsiensis(KT2)
 L   Q   E   Y   V   F   Y   G   S   S   I   F   Y   E   P   Q   N   S   L   L   N   -   S   Y   R
```

图 7-38　三七等 *matK* 序列（上行）及其氨基酸序列（下行）部分片段同源性比较

序列上方数字为自上游核苷酸位置；-代表排序空位

表 7-21 三七等 18S rRNA 基因序列（右上角 数字）和 *matK* 基因序列（左下角数字）及其氨基酸序列（左下角括号内数字）变异位点数

样品代码	Pn	Pj	Cp	Cw	Ck
Pn	—	2	94	94	93
Pj	5(3)	—	94	94	93
Cp	271(133)	271(134)	—	0	1
Cw	271(133)	271(134)	0(0)	—	1
Ck	271(133)	271(134)	0(0)	0(0)	

【附】 采用 18S rRNA 通用引物进行 PCR 扩增均能得到预期 1.8bp 片段的产物。经过测序，三七和竹节参 18S rRNA 基因核苷酸序列长度均为 1809bp，而 3 个姜科莪术类样品其长度均为 1811bp。根据排序比较，三七和伪品竹节参间仅 2 个变异位点，即第 714 号和第 1721 号核苷酸位置发生转换替代（C-T 或 T-C）；三七和莪术类伪品间则共有 94 个碱基发生置换。而 3 个莪术间只有 1 个变异位点，即第 234 号核苷酸位置桂莪术与温莪术和蓬莪术存在转换替代（T-C），温莪术与蓬莪术序列完全相同。

三七和竹节参的 *matK* 基因部分核苷酸序列长度为 1259bp；3 个姜科莪术类样品完整的 *matK* 长度均为 1548bp，编码 515 个氨基酸成熟酶蛋白质。根据它们的 *matK* 基因 1283bp 共同区域（据其推导有 426 个氨基酸）排序比较，三七和伪品竹节参间存在 5 个碱基置换，而氨基酸序列只有 3 个变异位点；三七和莪术类伪品间则共有 271 个核苷酸变异位点，133 个氨基酸变异位点。3 个莪术间则无变异位点，*matK* 基因及其氨基酸序列完全相同

22. 银杏

【来源】 本品为银杏科植物银杏（*Ginkgo biloba* L.）。

【RAPD 鉴别】

（1）材料 包括 24 个雌株类型（G1-G24）和 4 个雄株类型（G25-G28）（表 7-22）。取幼嫩叶片，清水洗净晾干后立即放在装有硅胶的密封塑料袋中迅速干燥。

表 7-22 实验材料

编 号	变异类型	编 号	变异类型	编 号	变异类型	编 号	变异类型
G1	泰兴 1 号	G8	苏农佛手	G15	小圆子	G22	小龙眼
G2	泰兴 2 号	G9	铁富宇香	G16	鸭尾银杏	G23	梅核 1 号
G3	泰兴 3 号	G10	马铃 1 号	G17	大佛手	G24	梅核 2 号
G4	泰兴 4 号	G11	马铃 2 号	G18	龙眼	G25	大花穗 1 号
G5	洞庭皇	G12	绿仁	G19	叶籽银杏	G26	大花穗 2 号
G6	新民 2 号	G13	大龙眼	G20	家佛指	G27	大花穗 3 号
G7	洞庭佛手	G14	小梅核	G21	小佛指	G28	大花穗 4 号

（2）方法

① DNA 提取　参照 Doyle 等的 CTAB 方法，并稍作改进。称取约 0.5g 的干燥叶片，在研钵中加液氮研磨成粉末状，转至 1.5mL 离心管中，立即加入 CTAB 提取缓冲液［100mmol/L Tris-HCl（pH8.0），20mmol/L EDTA，1.4mol/L NaCl，2% CTAB，2% β-巯基乙醇］，65℃水浴 40min，用等体积的氯仿-异戊醇（24：1）抽提，0℃离心 10min（11000r/min），取上层水相，加入 1/10 体积的 10% CTAB-0.7mol/L NaCl，轻轻混匀；再加入等体积的氯仿-异戊醇（24：1）抽提，离心；取上层水相，加入 2/3 体积－20℃预冷的异丙醇沉淀 DNA，离心 1min（8000r/min），使 DNA 附着离心管管底，但不要结块，弃水相；DNA 沉淀用 75%乙醇洗涤 2～3 次，风干后溶于适量的 1×TE（含 20μg/mL RNA 酶），37℃水浴 30min；再用等体积的氯仿-异戊醇（24：1）抽提，离心；取上层水相，加入 1/10 体积 3mol/L NaAc（pH5.2）和 2 倍体积的无水乙醇沉淀 DNA，然后将其转至 75%乙醇中，洗 2～3 次，去乙醇，风干；溶于 200μL 0.1×TE，置 4℃备用。

② PCR 反应　反应体系 25μL，包括：5μmol/L 的引物 2μL，2mmol/L dNTP 1μL，10×buffer（含 20mmol/L $MgCl_2$）2.5μL，5U/μL Taq 酶 0.2μL，10ng/μL 模板 DNA 2μL 和灭菌双蒸水 17.3μL。反应程序为：94℃ 5min，37℃ 1min，72℃ 1min，此程序 2 个循环后接 94℃ 1min，36℃ 1min，72℃ 2min，38 个循环后接 72℃ 10min。每个引物均以 2min 灭菌双蒸水作对照。PCR 反应产物在 1.5%的琼脂糖凝胶（含 0.5μg/mL EB）上电泳。

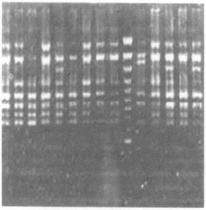


图 7-39　银杏变异类型的 RAPD 指纹图（引物 D12）

③ 数据分析　电泳图谱中的每一条带均为一个分子标记，代表在模板上有一个引物结合位点，不同的样本在凝胶上泳动距离相同则表明他们有相同的位点。统计时以二元数据表示，有带的记为“1”，无带的记为“0”。

（3）结果　见图 7-39、表 7-23。

【附】对28 个银杏变异类型的 DNA 进行扩增。每个样品共扩增出 128 条 RAPD 谱带，平均每个引物可扩增出 8.5 条。一般来说，RAPD 分析中 1 条扩增片段至少代表基因组的 1 个位点，因此，128 个标记意味着对供试银杏基因组的至少 128 个位点进行了检测，其中有 39 个位点具有多态性，占 30.5%。

表 7-23　28 个银杏变异类型 DNA 扩增出的 RAPD 指纹图

引物	总位点数	多态位点	引物	总位点数	多态位点
A07	3	0	D03	9	2
A08	14	2	D12	9	3
A10	11	3	HO1	10	6
B13	9	3	H11	13	5
C02	7	0	I08	6	3
C03	7	3	J04	10	4
C09	9	1	J14	6	2
C17	5	2			

参　考　文　献

1　曹辉，刘玉萍．基因技术在生药分析中的研究进展［J］．中国实验方剂学杂志，2002，S1：107～112

2　牛屹东，李明，魏辅文等．线粒体 DNA 用作分子标记的可靠性和研究前景［J］．遗传，2001，23（6）：593～598

3　于惠敏．植物的叶绿体基因［J］．植物生理学通讯，2001，37（5）：483～488

4　柴守诚，员海燕．高等植物 DNA 重复序列的主要类型和特点［J］．西北植物学报，1999，19（3）：555～563

5　田欣，李德铢．DNA 序列在植物系统学研究中的应用［J］．云南植物研究，2002，24（2）：170～184

6　张军丽，王峥峰，李鸣光等．植物种群研究中的分子标记及其应用［J］．应用生态学，2000，11（4）：631～636

7　严华军，吴乃虎．DNA 分子标记技术及其在植物遗传多样性研究中的应用［J］．生命科学，1996，8（3）：32～36

8　罗怀容，施鹏，张亚平．单核苷酸多态性的研究技术［J］．遗传，2001，23（5）：471～476

9　王阳顺．RAPD 技术在中药材鉴定中的应用［J］．广东药学院学报，2001，17（1）：19～21

10　Wiliams JCK，KubellikAR，Livak KJ et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers［J］，Nucleic Acide Research. 1990，18（22）：6531～6535

11　Wesh J and Moclel M. Fingerprinteing genomes using PCR Which arbitrary Primers［J］. Nucleic Acids Research. 1990，18（24）：7213～7218

12　高文远，秦恩强，肖小河等．当归药材道地性的 RAPD 分析［J］．中草药，2001，32（10）：926～929

13　罗志勇，周钢，周肆清等．AFLP 法构建人参、西洋参基因组 DNA 指纹图谱［J］．药学学报，2000，35（8）：626～629

14　蔡朝晖，李萍，董婷霞等．贝母的分子生物学鉴定方法的研究［J］．药学学报，2000，35（4）：309～312

15　马永红，党荣理，吴霞等．新疆中麻黄 DNA 片段的克隆与序列分析［J］．药物生物技术，2004，11（1）：16～18

16 丁建弥，万树文，梅其春等. 用随机扩增多态 DNA（RAPD）技术鉴定山参［J］. 中成药，2001，23（1）：3～5
17 新吴霞，刘庆华，马永红等. 新疆产甘草 6 个不同地理群体遗传关系的 RAPD 分析［J］. 中国生化药物杂志，2003，24（4）：191～193
18 唐双焱，傅文，陈永久等. 中药材鹿茸的分子分类学鉴定研究［J］. 中国药学杂志，2002，37（4）：258～260
19 梁之桃，秦民坚，王峥涛等. 柴胡属 5 种植物 RAPD 分析与分类鉴定［J］. 中草药，2002，33（12）：1117～1119
20 肖小河，刘峰群，史威和等. 国产姜黄属药用植物 RAPD 分析与分类鉴定［J］. 中草药，2000，31（3）：209～212
21 刘文生，朱建明，何斌等. 中药材厚朴的随机扩增多态性 DNA 指纹图谱研究［J］. 中药材，2004，27（3）：164～169
22 刘向华，王义权，刘忠权等. 中药材蛇胆的 DNA 分子标记鉴定研究［J］. 药学学报，2001，36（3）：229～232
23 刘塔斯，李钟，刘春林. 玉竹及其混淆品黄精的 RAPD 分析. 中国药学杂志［J］，2002，37（10）：734～736
24 张容，张步振，叶浩. 用 RAPD 分析法鉴定木蓝属生药［J］. 中国中药杂志，1997，22（2）：72～73
25 刘中权，王义权，周开亚等. 中药材龟甲及原动物的高特异性 PCR 鉴定研究［J］. 药学学报，1999，34（12）：941～945
26 李国强，王峥涛，李晓波等. 中药蓼大青叶及其伪品的 nrDNA ITS 区序列的测定［J］. 中国野生植物资源，2001，20（3）：43～46
27 Pang Chui Shaw 等. 用随机引物聚合酶链反应法鉴别人参属植物药材及其伪品［J］. 特产研究，1996（3）：56～58
28 陈林娇，屈良鹊，施苏华等. RAPD 技术在溪黄草类原植物鉴别中的应用［J］. 中国中药杂志，1998，23（6）：328～331
29 王爱民，季申. 两种药用石斛 RAPD 反应的实验简报［J］. 中药材，2002，25（5）：324～325
30 黄丰，王培训，周联，曹柳荚，梁瑞燕，徐鸿华. 诃子及其混淆品. 中草药，2000，31（9）：697
31 曹晖，刘平萍，伏见裕利，小松かの子. 三七及其伪品的 DNA 测序鉴别［J］. 中药材，2001，24（6）：398～403
32 刘叔倩，马小军，郑俊华. 银杏不同变异类型的 RAPD 指纹研究，2001，26（12）：822～825
33 刘玉萍，何报作，曹晖. 基因测序技术在中药质量研究中的应用（Ⅱ）—山药基原的 DNA 测序鉴别. 中草药，2001，32（11）：1030～1034

（李晓波，李仁伟，郑春英，张贵君）

第八章　mRNA差异显示鉴定法

mRNA差异显示鉴定法是利用中药不同组织或细胞在基因表达（gene expression）上的差异进行鉴定的一种方法。它通过将总RNA反转录成单链cDNA（complementary DNA），然后进行PCR扩增反应，分离出不同分子大小的DNA，挑选出有差异的表达基因进行序列分析。既可以制备探针用于稳定灵敏的检测实验，也可以制备其蛋白产物及其抗体进行免疫检测。采用该技术，可以提炼出栽培和野生、道地和普通药材等之间的特征，可望广泛用于中药的品质鉴定。

第一节　基本理论

高等生物一般具有10^5个不同的基因，在单个细胞或个体中仅有约15%的基因得到表达，产生15000种mRNA。基因的差别表达决定了所有的生命过程，如发育和分化、静态、细胞周期、对环境压力的反应、衰老和死亡。正常代谢过程或病理变化无论是由单基因控制还是多基因体系控制，本质上都是由于基因表达改变所致。比较不同细胞或基因型的基因表达为解生命过程打开了大门。目前，检测基因表达差异常用的方法有减法杂交、差异杂交、mRNA差异显示技术，mRNA差异显示技术是近几年来较为广泛应用的方法之一。

mRNA差异显示（mRNA differential display）的方法是1992年美国波士顿的Dena-Farber癌症研究所的两名科学家P. Liang和A. D. Pardee创立的，是一种比较不同细胞系、不同组织间，或同一细胞系、同一组织不同条件下基因表达差异的方法，可以从一对细胞群体和基因型各自所产生的15000种mRNA中有效地鉴别并克隆差别表达的基因。

一、mRNA差异显示技术的基本原理

真核细胞mRNA 3′端有一个由30～300个腺苷组成的poly（A）结构，与3′端的poly（A）尾相连的前面的两个碱基只有12种组合，即GG、GC、GA、GT、CC、CG、CA、CT、TT、TG、TA、TC。因此，人工合成与poly（A）配对oligo（dT）并接上与上述12种组合相配的两个碱基作为引物，每组引物锚定总mRNA的1/12，故称这种引物为锚引物。锚引物与mRNA 3′端锚定后，在逆转录酶的作用下生成cDNA的第一条链；然后再加入由10个碱基组成的随机引物，以生成的第一条链为模板，进行低温退火的PCR扩增，因不同的

mRNA扩增产物的大小不同，通过变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，通过自显影或荧光显色检测得到 mRNA 的指纹图谱。两种以上细胞的 mRNA 指纹图谱比较可得到差异表达的 mRNA 带，可进一步扩增、筛选、克隆和鉴定。

由于基因表达的差异，在同量总 RNA 或总 mRNA 逆转录后，用随机引物扩增，则可以在 DNA 水平上用变性 PAGE 电泳显示出表达水平上的差异。对应于这些 mRNA 的 DNA 序列可以回收、克隆、测序以及用于制备杂交或者文库筛选的探针。

二、操作流程

可比较的细胞或组织 RNA 提取物

↓ 反转录　锚定引物 T12MN(M 为除 T 以外的任意核苷酸,N 为 G、A、T 或 C)

cDNA

↓ PCR 扩增　锚定引物,任意引物,^{35}S-dATP

聚丙酰胺凝胶电泳

↓

回收差异片段,再次 PCR 扩增

↓

Northern 印迹　测序　cDNA 文库筛选探针

RNA 样品可被四套简并锚式 oligo（dT）引物（T12MN）中的任意一个逆转录，其中 M 可以为 G、A 或 C；N 为 G、A、T、C。每套引物由 3′端碱基（N）决定，而倒数第二个位置（M）具有简并性，例如下面所示 N 为 G 的一套三个引物：5′-TTTTTTTTTTTTGG-3′、5′-TTTTTTTTTTTTAG-3′、5′-TTTTTTTTTTTTCG-3′。

理论上 mRNA 差异显示技术能使细胞的每一条 mRNA 均有扩增的机会，故可以同时检测其全部表达基因，可以同时进行多组间样本的比较分析，同时检测基因的上调和下调表达；与同类方法相比具有操作简单、快速的特点。但在实际应用中较为突出的缺点是假阳性问题，即电泳显示的差异条带不能在 Northern 印迹上完全重现。

第二节　mRNA 差异显示鉴定的方法

一、材料与引物的选择

1. 实验材料的选择

选择的细胞或组织除在时间、空间上基本一致外，相互比较的样品基因型应

相同或相近，以减少非相关带的检测。

2. 引物的选择

mRNA 差异显示需要随机引物和锚引物两种，引物选择策略一般以 25 个碱基随机引物和两个锚碱基的 29 个碱基的锚引物。同时使用高浓度（50mmol/L）的 dNTP，抗 Taq 酶抗体介导的热启动 PCR，其中 Taq 酶与长的和精确度高的两种温稳 DNA 聚合酶混合使用，取得了更好的差异显示结果。

二、RNA 的提取

mRNA 差异显示中对 RNA 提取过程没有特殊要求，多种方法得到的 RNA（包括总 RNA 或纯化的 mRNA）均可用于 mRNA 差异显示。目前，使用较普遍的有酸性胍-酚-氯仿法、热酚法等。使用市售 RNAkit 或 RNAzol 试剂更为方便。清除 DNA 污染十分重要，一般可先用 LiCl 洗涤，而后用无 RNase 的 DNase 处理；也可以在 RNA 提取过程中直接加入 10U DNase Ⅰ 或提取后以 Message-Clean Tm kit 处理。

为减少假阳性，相比较的样品应用同种方法同时抽提，且提取的 RNA 符合以下条件。

① RNA 无污染。提取总 RNA 时难免有染色体 DNA 的污染，它可以作为 PCR 的模板形成凝胶带上的假阳性条带。所以提取的总 RNA 在逆转录前须经 DNase Ⅰ 消化。

② RNA 分子完整。总 RNA 由少量的 mRNA、hnRNA 和大量的 rRNA（18S、28S、5.8S、5S）组成，可以通过电泳检测 28S rRNA 和 18S rRNA 来判断总 RNA 的质量。

三、逆转录和 cDNA 扩增

逆转录条件和引物种类有关，如以 FITC 标记的 3′-引物，则总 DNA 量不少于 2.5ng；如果以 dT11VN（V 为 C、G、A；N 为 T、C、G、A）引物，总 RNA 量只需 0.1～0.2ng。引物终浓度一般为 0.4pmol/L，逆转录后，在 Taq 酶催化下合成 cDNA 第二链，反应条件一般为 94℃ 变性 5min，40℃ 不严格复性 5min，72℃ 延长 5min。随后在不严格条件下进行 30～40 个 PCR 循环，条件为 94℃ 30～60s，42～60℃ 60s，72℃ 30～120s，最后 72℃ 延伸 5min。

四、筛选和再扩增

上述 PCR 产物 2～4μL 经 4.5%～6% 聚丙烯酰胺-7mol/L 尿素变性凝胶电泳而分离。但是也有不用变性凝胶电泳的，认为后者可以避免 DNA 因变性程度

不同而产生几条带，可使复杂性降低。电泳后经自显影和荧光显影，找出差异带，切下后转入 Eppendorf 管中，以过去的条件加入引物、dNTP，再扩增 20～30 个循环。

五、鉴定

筛选出的差异带是否是真正的差异，即是否来源于其中一个样品而不出现于另一个样品，其序列如何等，必须经过鉴定予以明确。目前，通常是先克隆到载体，而后制成探针，进行 Northern 杂交和测序，也可以直接测序；也可以在第二次 PCR 中加入 [α-^{32}P]CTP 925kb，而后用 2%的低熔点凝胶电泳纯化，直接用作 Northern 杂交的探针，使步骤简便。5′端带酶切位点的引物所进行的 mRNA差异显示，此时可直接克隆入载体，也可以进一步扩增、测序。如证实为新基因，可以通过基因库调出全序列，了解其性质，还可以表达出产物，免疫动物，制成抗体进行免疫组化，也可以原位杂交了解组织和细胞内分布，以进一步探讨其功能和意义。

第三节　差异表达基因芯片

一、基本原理与芯片的制作

1. 基本原理

基因芯片技术（DNA chip technique）也称为cDNA微阵列杂交技术（cDNA microarray hybrization），其原理是将大量探针分子固定于支持物上，标记的样品 cDNA 与探针杂交，杂交信号阳性的探针分子就是在组织或细胞中表达的分子片段。基因芯片由于同时将大量的探针固定于支持物上，所以可以一次性地对细胞内多种分子进行检测和分析，从而找到差异分子。这种方法灵敏度高，重复性好，通过商品化的芯片和采用自动化分析技术，使寻找差异基因和功能基因的工作变得简单快速。

表达芯片主要是分析两组来源不同的 mRNA 转录丰度的差异，是芯片技术最常见最广泛的应用。DNA 微阵列和寡核苷酸基因芯片两种不同芯片模式在基因表达谱分析方法上有所不同。

采用 DNA 微阵列模式，两组 mRNA 样本分别反转录成 cDNA 并分别掺入可分辨的不同荧光素标记（如 Cy3 和 Cy5），二者同比例混合并同时和 DNA 微阵列杂交。

cDNA 阵列芯片是以定量的方式同时检测大量基因相对表达的新方法，它已成功地应用于同时检测 1000 多个基因的表达，如测定拟南芥、酵母、病毒样品

的基因表达水平。Schena 等人用含有 48 种成对的 cDNA 材料的芯片测定了拟南芥的基因差别表达。他们还用热休克或佛波酯调节基因的双色差异检测，分析了 1046 种人未知序列的 cDNA。目前，Monsanto Co. 和 Synteni/Incyte 公司合作开发了拟南芥的玻璃微阵列芯片，使用14443个基因不同表达对叶子、根和花序组织的基因表达进行了比较研究。基因芯片经由荧光标记，其检测灵敏度非常高，且检测范围大，不同强弱信号在同一芯片上同时检测，获得大量关于基因水平的信息。

采用寡核苷酸基因芯片模式，两组 cDNA 样本带上同种荧光素标记，但分别和芯片单独杂交再进行比较。二者都要通过计算两组样本杂交信号的比值（ratio）并通过设立阈值（threshold）来确定已知基因在不同来源样本中表达的差异或寻找不同样本间差异表达的基因。

寡核苷酸阵列芯片的检测灵敏度高，可检出一个碱基的错配，但寡核苷酸芯片的制作是基于 DNA 序列已知的情况下，而 cDNA 片段可以来自序列未知的 cDNA 克隆、EST 克隆、隐含的基因组克隆或已知基因组序列的扩增 ORF。目前，能用于寡核苷酸微阵列芯片的序列已知的植物数量极少，如集胞藻、荚膜红细菌、拟南芥、酵母等。

2. 芯片的制作

基因芯片固相载体上可以固定 cDNA 或寡核苷酸。其制造工艺大致可以分为原位合成法和点样法两种。原位合成法适用于寡核苷酸；点样法多用于大片段 DNA，有时也用于寡核苷酸，甚至 mRNA。

原位合成法有光蚀刻法和喷印法。光蚀刻法可以合成 30nt 左右，每步缩合率较低，一般为 95%左右，合成 30nt 产率仅 20%；喷印法可以合成 40～50nt，每步缩合率可达 99%以上，合成 30nt 产率可达 74%。此外，喷印法不需特殊的合成试剂。与原位合成法比较点样法较简单，只需将预先制备好的寡核苷酸或 cDNA 等样品通过自动点样装置点于载体上。

点样法所用的载体多为玻璃片，点样前需对载体表面进行化学修饰。与多孔尼龙膜相比玻璃片具有杂交体积小、低荧光背景，同时支持两种荧光素等优点。其他可用的固相载体还有尼龙膜、硝酸纤维膜、活化葡萄糖凝胶、琼脂糖、甲基丙烯酸共聚物、丙烯酰胺、聚苯乙烯等。

二、差异表达基因芯片实验方法

实验一般包括样品制备、杂交反应、检测、数据处理和建模。

1. 样品制备

一般一张表达谱芯片需要 3μg mRNA。不同组织抽提率不同。考虑到个体差异以及样品在研磨、匀浆等过程中的损失，一般提供的样品量应增加 1～2 倍。

待分析样品（mRNA）后通过逆转录反应或末端标记法可以标记不同荧光素或^{32}P。

2. 杂交反应

待分析基因在与芯片结合探针杂交之前必须进行分离、扩增及标记。根据样品来源、基因含量及检测方法和分析目的不同，采用的基因分离、扩增及标记方法各异。

常规的基因分离、扩增及标记技术完全可以采用，也可以采用高度集成的微型样品处理系统，如细胞分离芯片及基因扩增芯片。标记方法目前应用较多的是荧光标记法，由于采用的荧光素种类更多，可以满足不同来源样品的平行分析。用计算机控制的高分辨荧光扫描仪可获得结合于芯片上目的基因的荧光信号，通过计算机处理即可给出目的基因的结构或表达信息。杂交条件的选择与研究目的有关，多态性分析或者基因测序时，每个核苷酸或突变位点都必须检测出来。通常设计出一套4种寡核苷酸，在靶序列上跨越每个位点，只在中央位点碱基有所不同，根据每套探针在某一特定位点的杂交严谨程度，即可测定出该碱基的种类。如果芯片仅用于检测基因表达，只需设计出针对基因中特定区域的几套寡核苷酸即可。表达检测需要更长的杂交时间、更高的严谨性、更高的样品浓度和低温度，这有利于增加检测的特异性和低拷贝基因检测的灵敏度。突变检测，要鉴别出单碱基错配，需要更高的杂交严谨性和更短的时间。此外，杂交反应还必须考虑杂交反应体系中盐浓度、探针GC含量和所带电荷、探针与芯片之间连接臂的长度及种类、检测基因二级结构的影响。

3. 检测

用同位素做标记的膜微阵列的杂交信号检测需通过传统的磷屏成像系统，而用荧光标记的芯片杂交后的检测需用专门的荧光扫描仪。然后同位素标记的膜片根据成像后信号的大小，荧光标记的信号根据扫描处理，分别筛选差异表达基因。

（1）荧光标记杂交信号的检测方法　使用荧光标记物的研究者最多，因而相应的探测方法也就最多、最成熟。检测方法基本上是将待杂交对象以荧光物质标记，如荧光素或丽丝胶（lissamine）等，杂交后经过SSC和SDS的混合溶液或SSPE等缓冲液清洗。

① 激光扫描荧光显微镜　将杂交后的芯片经处理后固定在计算机控制的二维传动平台上，并将一物镜置于其上方，由氩离子激光器产生激发光经滤波后通过物镜聚焦到芯片表面，激发荧光标记物产生荧光，光斑半径约为5～10μm。同时，通过同一物镜收集荧光信号经另一滤波片滤波后，由冷却的光电倍增管探测，经模数转换板转换为数字信号。通过计算机控制传动平台*X*-*Y*方向上步进平移，DNA芯片被逐点照射，所采集荧光信号构成杂交信号谱型，送计算机分

析处理，最后形成 20μm 像素的图像。这种方法分辨率高、图像质量较好，适用于各种主要类型的 DNA 芯片及大规模 DNA 芯片杂交信号检测，广泛应用于基因表达、基因诊断等方面研究。

② 激光扫描共焦显微镜　激光扫描共焦显微镜与激光扫描荧光显微镜结构相似，但是由于采用了共焦技术因而更具优越性。这种方法可以在荧光标记分子与 DNA 芯片杂交的同时进行杂交信号的探测，而无须清洗掉未杂交分子，从而简化操作步骤提高了工作效率。

操作方法是将靶 DNA 分子溶液放在样品池中，芯片上合成寡核苷酸阵列的一面向下，与样品池溶液直接接触，并与 DNA 样品杂交。当用激发光照射使荧光标记物产生荧光时，既有芯片上杂交的 DNA 样品所发出的荧光，也有样品池中 DNA 所发出的荧光，如何将两者分离开是一个非常重要的问题。而共焦显微镜具有良好的纵向分辨率，可以在接受芯片表面荧光信号的同时，避开样品池中荧光信号的影响。一般采用氩离子激光器（488nm）作为激发光源，经物镜聚焦，从芯片背面入射，聚集于芯片与靶分子溶液接触面。杂交分子所发的荧光再经同一物镜收集，并经滤波片滤波，被冷却的光电倍增管在光子计数的模式下接收。经模数转换反转换为数字信号后送微机处理，成像分析。

在光电倍增管前放置一共焦小孔，用于阻挡大部分激发光焦平面以外的来自样品池的未杂交分子荧光信号，避免其对探测结果的影响。激光器前也放置一个小孔光阑以尽量缩小聚焦点处光斑半径，使之能够只照射在单个探针上。通过计算机控制激光束或样品池的移动，便可实现对芯片的二维扫描，移动波长与芯片上寡核苷酸的间距匹配，在几分钟至几十分钟内即可获得荧光标记杂交信号图谱。其特点是灵敏度和分辨率较高，扫描时间长。

③ CCD 相机的荧光显微镜　探测装置与扫描方法都是基于荧光显微镜，但是以 CCD 相机作为信号接收器而不是光电倍增管，因而无须扫描传动平台。由于采用了 CCD 相机，因而大大提高了获取荧光图像的速度，曝光时间可缩短至零点几秒至十几秒。其特点是扫描时间短、灵敏度和分辨率较低，比较适合临床诊断用。

（2）生物素标记方法中的杂交信号探测　以生物素（biotin）标记样品通常都要联合使用其他大分子与抗生物素的结合物（如结合化学发光底物酶、荧光素等），再利用所结合大分子的特殊性质得到最初的杂交信号，由于所选用的与抗生物素结合的分子种类繁多，因而检测方法也更趋多样化。特别是如果采用尼龙膜作为固相支持物，直接以荧光标记的探针用于 DNA 芯片杂交将受到很大的限制，因为在尼龙膜上荧光标记信号信噪比较低。因而使用尼龙膜作为固相支持物的这些研究者大多是采用生物素标记的。

用基因芯片进行的表达水平检测可自动、快速地检测出成千上万个基因的表

达情况。Schena 等采用拟南芥基因组内共 45 个基因的 cDNA 微阵列（其中 14 个为完全序列，31 个为 EST），检测该植物的根、叶组织内这些基因的表达水平，用不同颜色的荧光素标记逆转录产物后分别与该微阵列杂交，经激光共聚焦显微扫描，发现该植物根和叶组织中存在 26 个基因的表达差异，而参与叶绿素合成的 CAB1 基因在叶组织较根组织表达高 500 倍。

4. 数据分析

为了使结果的检验更加简便和快速，Affymetrix 基因芯片的分析系统中采用了基因阵列扫描仪和专用的基因芯片工作站，对一幅包含数万个探针位点的基因芯片图样的分析仅需数分钟的时间。这样在短短的几十分钟至数小时内，就可以完成用传统方法需要数月才能完成的几万乃至几十万次杂交分析试验。

三、差异表达芯片的应用

1. 基因型、基因突变和多态性分析

在同一物种不同种群和个体之间，有着多种不同的基因型，而这种不同，往往与个体的不同性状和多种遗传性疾病有着密切的关系。通过对大量具有不同性状的个体的基因型进行比较，就可以得出基因与性状的关系。但是，由于大多数性状和遗传特征是由多个基因同时决定的，因此分析起来就十分困难，然而基因芯片技术恰恰解决了这一问题，利用其可以同时反应数千甚至更多个基因的特性，就可以分析基因组中不同基因与性状的关系。

2. 基因表达图谱的绘制

斯坦福大学的 Brown 研究小组应用自制的点样仪制备了酵母基因芯片，对不同细胞周期和外界环境中酵母基因的表达图谱进行了检测，用酵母 6220 个基因中的 2473 个基因点样放置于芯片的相应位置上，通过杂交获得了处于不同周期状态的细胞在热休克、冷休克以及二硫苏糖醇（DTT）处理后细胞的表达图谱，根据获得的全部 79 张基因表达图谱，以表格的方式绘制出了新的酵母表达图谱，直接揭示出基因组中各基因的相互关系，直观地反应出了在不同状态和条件下基因转录、调控和表达差异，从而可以通过基因组转录效率来获得共同表达基因组及其调控信息。研究表明，禾本科不同亚科之间存在广泛的 DNA 共线性，可以使用一套锚 cDNA 探针来绘制各个物种的表达图谱，在此基础上绘制出禾本科复合图谱。这样的一套探针已经建立，它包括水稻、燕麦、大麦和小麦 cDNA 文库的 152 个 cDNA 克隆，为 DNA 芯片研究基因表达及相互关系提供了丰富的数据库资源。

3. 寻找目标基因和基因功能

利用基因芯片进行基因表达差异分析，找出表达差异的目的性状基因，使药用植物改良和育种工作实现从表型选择到基因选择的根本改变，特别是对许多由

多基因控制的数量性状遗传，基因芯片可同时平行检测不同层次多基因协调作用。一些学者将基因芯片技术与差异表达技术有机地结合，通过对两种组织进行差异比较，提供差异表达基因的浓聚物，将这些克隆 cDNA 点到基因芯片上，快速筛选目标基因。Derisi（1997）等应用酵母 cDNA 基因芯片研究在有丝分裂和孢子状态下基因转录，他们发现有上千条基因在转录水平上发生了变化，其中大部分是首次发现与酵母孢子状态有关。

4. 分子生态机理的研究

用于大规模研究外部环境因素和内部生境条件对植物的遗传组成及基因表达的影响，为分子生态学的研究提供了新的手段。Affymetrix 公司制备的酵母基因表达型芯片，包括酵母基因组开放读码框中的 260000 个 25mer 探针阵列。采用这种基因芯片对不同生活环境状态下酵母基因表达进行了研究。他们发现，对于在营养丰富或贫乏的培养基上生长的酵母，90%以上的酵母基因没有明显的表达差异。但有 36 个基因在营养丰富的培养基上生长时有较多的表达，而另 140 个基因在贫乏的培养基上生长时表达增加。森林是世界上最大的自然资源之一，但它的培育期长，育种困难。生长迅速、纤维素含量高、木质素含量低的树木有很高的经济价值，采用芯片技术检测生态环境对树木基因表达的影响，可加速育种。

第四节　常用中药鉴定举例

1. 魟尾刺

【来源】 本品为魟科动物赤魟（*Dasyatis akajei* Muller et Henle）、花点魟（*D. uarnak* Jordan et Hubbs）和黄点魟（*D. gerrardi* Dor）等的尾刺。

【cDNA 表达文库构建】

（1）仪器　SMART™ cDNA Library Construction Kit（Clontech 公司）等。

（2）试剂　哺乳动物细胞高效表达载体质粒 pcDNA 3.0（Invitrogen 公司），*E. coli* 宿主菌 DH5α。

（3）方法

① 赤魟尾刺的处理　剥离活赤魟的尾刺 5 枚，液氮中充分研磨，待液氮挥发完全后，加入适量的异硫氰酸胍变性液（4mol/L 异硫氰酸胍；25mmol/L 柠檬酸钠，pH7.0，0.5% SLS；0.1mol/L β-巯基乙醇），－80℃冰箱中保存以备提取总 RNA。

② 载体质粒 pcDNA 3.0-Sfi Ⅰ的构建　PEG 纯化法提取 pcDNA3.0 质粒，经限制性内切酶 *Eco*R Ⅰ和 *Not* Ⅰ作用后，进行琼脂糖凝胶电泳。按 Omega Biotek 公司的 Gel Extraction Kit 说明书操作，胶回收上述酶切载体 DNA。为引

入 *Sfi* Ⅰ酶切位点，以λTriplEx2为模板，用 SMART™ Kit 中测序引物扩增后，PCR 产物经 *Eco*R Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 酶切，T4 DNA 连接酶连接经 *Eco*R Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 酶切的 pcDNA 310 载体 DNA 和 PCR 产物构建成 pcDNA 3102*Sfi* Ⅰ 质粒。提取 pcDNA3.0-*Sfi* Ⅰ 用 *Sfi* Ⅰ 酶切后，胶回收同上；重复 *Sfi* Ⅰ 酶切和回收操作各 1 次，载体 DNA 以 50ng/nL 的浓度保存备用。

③ 赤魟尾刺总 RNA 的提取　按一步快速热酚法抽提保存于变性液中的赤魟尾刺组织总 RNA。

④ 赤魟尾刺 cDNA 的合成　按 Clontech 公司 SMART™ cDNA Library Construction Kit 说明书操作。进行第一链合成，LD PCR cDNA 扩增，酶切消化和柱回收 cDNA。

⑤ 赤魟尾刺 cDNA 文库的构建　T4 DNA 连接酶连接上述分别经 *Sfi* Ⅰ 酶切处理好的 pcDNA 3.0-*Sfi* Ⅰ 载体和 cDNA，连接产物高效转化 DH5α 感受态细胞。转化产物则被分为两部分，其中一部分经扩增后，作为 cDNA 表达文库总库保存于 25%甘油中，−80℃冻存；另一部分等分为 100 个亚文库，经分别扩大培养后，同样于 25%甘油中冻存备用。

⑥ 序列测定　随机挑选亚文库克隆，利用 OMEGABIOTEK Plasmid Miniprep Kit 提取质粒 DNA。以 T7 和 SP6 为测序引物，采用 ABI377 DNA Sequence DNA 自动序列仪进行正反向序列测定。

(4) 结果

① 赤魟尾刺总 RNA 的提取　用异硫氰酸胍一步法提取的赤魟尾刺总 RNA 经 1%甲醛变性胶电泳检测可见清晰的 28S 和 18S 两条 rRNA 条带，其中 28S 条带亮度两倍于 18S 带（图 8-1），表明组织总 RNA 完整性良好。

② cDNA 的合成　取总 RNA 约 1μg 直接进行逆转录合成第 1 链，取 1P5 的第 1 链产物 LD PCR 法扩增富集 cDNA，cDNA 的一半经酶切消化和柱回收得到双链 cDNA 7μL。LD PCR 产物电泳结果呈现从大到小均匀的 smear 涂布，大小在 0.1～5.0kb，且主要集中于 500bp 以上，但未见特征性亮带（图 8-2）。表明所合成的 cDNA 编码蛋白分子量较分散，赤魟尾刺的成分多样和转录的mRNA 较为复杂。

③ 赤魟尾刺 cDNA 表达文库的构建和鉴定　取 cDNA 1μL 用于连接反应，反应体系 5μL，转化其中 1μL，取 1/100、1/10 和 3/10 体积转化液分别涂板，其余用于摇总库菌落；隔日记数平板的单菌落数分别为：52 个、497 个和 1511 个。因此双链 cDNA 7μL 可获得的 cDNA 表达文库克隆数为 [(52+497+1511)×(100P41)]×5×7=117585×105。文库总质粒的酶切和 PCR 分析结果表明，经 *Sfi* Ⅰ 酶切的总库质粒呈现 0.1～5.0kb 的均匀 smear 涂布，利用载体多克隆位点两端的 T7 和 SP6 引物扩增的 PCR 产物电泳也出现类似涂布（图 8-3），这与

cDNA 的大小相互吻合。通过载体自连片段的特异引物 PCR 扩增鉴定，重组率超过 95%（4/187），部分重组子克隆的 PCR 分析结果显示大部分的插入片段大于 500bp（163/187）（图 8-4）。

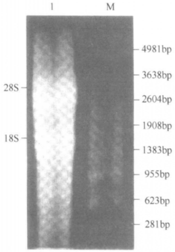


图 8-1　赤魟尾刺总 RNA 的电泳检测

M—RNA ladder；1—总 RNA

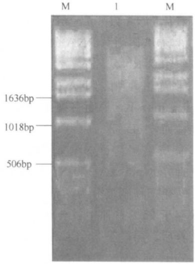


图 8-2　合成双链 cDNA 的电泳检测

M—1kb DNA ladder；1—双链 cDNA

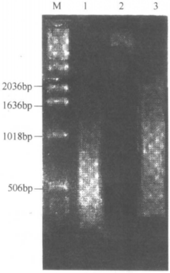


图 8-3　赤魟尾刺 cDNA 文库总质粒的酶切和 PCR 扩增电泳图谱

M—1kb DNA ladder；1—酶切质粒；2—总质粒；3—质粒的 PCR 扩增

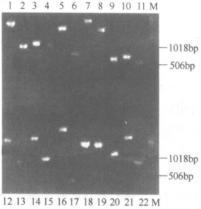


图 8-4　赤魟尾刺 cDNA 文库部分重组子的 PCR 扩增电泳图谱

M—1kb DNA ladder；1～22—PCR 扩增识别的赤魟尾刺 cDNA 文库的部分重组子

以上结果显示构建的赤魟尾刺 cDNA 表达文库在文库重组子数、重组率和插入片段大小等方面均符合良好文库的质量标准。

④ 赤魟尾刺 cDNA 的序列测定　随机测定了 150 个克隆的 DNA 序列，其中 3 个序列有 4 次重复克隆、12 个序列重复了 3 次、28 个序列重复克隆 2 次和单个克隆的序列 46 个。测序结果表明赤魟尾刺 cDNA 文库包含的基因多种多样，这与赤魟尾刺成分复杂多样相一致；序列的重复率不高和无规律性，可能与测序的总克隆数不多有关。所得序列经初步 Blast X 比对分析表明，已获得了 56 个赤魟新 EST 序列，其中已确定的全长 cDNA 克隆有 24 个，包括核糖体蛋白、热休克蛋白、信息传导相关蛋白、血色素蛋白、结构蛋白和多肽类等。全长cDNA 克隆中具药用开发前景的基因有 IPL 肿瘤抑制因子、亲环素 A（cyclophilin A)、硒蛋白 W（selenoprotein W)、半胱氨酸蛋白酶抑制剂和钙调节血红蛋白等（表 8-1)。

表 8-1　赤魟尾刺 cDNA 文库分析

基因组	克隆号	cDNA 重组数/bp	源蛋白大小/aa	Blast 分析
核糖体蛋白	CH149	789	172	60S 核糖体蛋白 L9(60S ribosomal protein L9)
	CH73	894	249	40S 核糖体蛋白 S6(40S ribosomal protein S6)
血色素蛋白	CH91	716	142	α-血红蛋白(hemoglobin alpha chain)
	CH69	1007	142	β-血红蛋白(hemoglobin beta chain)
金属黏蛋白	CH2	807	203	锌指蛋白(zinc finger protein)
	CH47	887	176	重铁蛋白(ferritin heavy-chain)
	CH85	794	87	硒蛋白 W(selenoprotein W)
信息传导相关蛋白	CH104	842	196	GTP 黏合蛋白(GTP-binding protein)
	CH65	1086	317	β-亚 G 蛋白(G protein beta subuit)
	CH48	804	195	钙调节血红蛋白(calcineurin homologous protein)
代谢调节蛋白	CH53	1618	518	细胞色素 C 氧化酶Ⅰ(cytochrome-c oxidase chain Ⅰ)
	CH59	665	165	ATP 酶脂 P3 蛋白前体(ATP synthase lipid-binding protein P3 precursor)
	CH86	589	117	真核细胞起始因子 4E(eukaryotic initiation factor 4 E-binding protein)
	CH96	798	246	酪胺酰 tRNA 酶(tyrosyl-tRNA synthetase)
结构蛋白	CH108	1106	299	核蛋白 B23(nucleolar protein B23)
	CH110	812	129	细胞角蛋白Ⅱ(type Ⅱ cytokeratin)
	CH18	633	89	动力蛋白轻链 LC6(dynein light chain LC6)
	CH42	993	298	骨连接蛋白(osteonectin)
	CH50	1460	418	26S 蛋白酶体 ATP 酶亚基(26S proteasome ATPase subunit)
其他	CH120	656	167	亲环素 A(cyclophilin A)
	CH123	811	136	IPL 肿瘤抑制因子(IPL tumor suppressor gene)
	CH14	1102	209	膜蛋白-4(claudin-4)
	CH61	724	103	半胱氨酸蛋白酶抑制剂[cystatin A1(stefin A1)]
	CH93	842	178	热休克蛋白 90(heat shock protein 90)

【附】 从文库中获得数个具有完整读码框（ORF）的基因序列，同源序列分析结果表明，上述 ORF 与 GenBank 数据库中已有基因序列对比无同源序列或同源性很低，提示它们极有可能是赤魟特有的基因，对这些基因的深入研究，将

揭示赤魟尾刺作为中药应用的独特生理活性和药理活性的分子机理。

2. 全蝎

〖来源〗 本品为钳蝎科动物东亚钳蝎（*Buthus martensii* Karsch.）的干燥全体。

〖cDNA 文库构建及神经毒素基因序列测定〗

（1）试剂 cDNA 库试剂盒（Life Technology 公司），PCR 试剂盒（Promega 公司），Sequenase 试剂盒（USB 公司）等。

（2）方法

① 蝎毒毒腺 mRNA 的提取及 cDNA 文库的构建 取 3g 蝎尾腺，在液氮中研磨成粉，用异硫氰酸胍热酚法抽提总 RNA，经 oligo（dT）$_n$ 亲和柱纯化得 mRNA。参照 Life Technology 公司所提供的 cDNA 库试剂盒，取 5μg mRNA 作为模板，反转录合成 cDNA 的第一条链，然后用 RNase H 除去 mRNA 模板，再用 T4 聚合酶合成双链 cDNA。双链两端接上接头，酶切后得到 5′、3′端分别为 *Sal* Ⅰ、*Not* Ⅰ 位点的双链 cDNA，选择 500bp 左右的双链 cDNA 片段克隆至 pSPORT 1 载体上，转化到 Mc1061 宿主菌中，共得到 4×104 个转化子。

② 引物合成 根据已发表的抗哺乳动物毒素 BmK 1 N 端 3～8 位保守的氨基酸序列（-D-A-Y-I-K-），在 DNA 自动合成仪上合成引物 1：5′-CG GAA TTC GAC GCT TAT ATT GCC AA-3′，在引物的 5′端加上 *Eco*R Ⅰ 酶切位点；另一相反引物即为载体 pSPORT 上 SP6 启动子序列：5′-AT TTA GGT GAC ACT ATA G-3′。待测得哺乳毒素的部分 cDNA 序列之后，又合成与其 3′端序列完全互补的引物 2：5′-CG GGA TCC TCA ACGA TGGCA TTTTC-3′，相应于毒素 C 末端序列（-G-K-C-H-R-终止子 TGA），在引物的 5′端加上 *Bam* H Ⅰ 的酶切位点，而其相反引物则利用 pSPORT 载体上合成的 T7 启动子序列：5′-CTCACTA TA GGGAAA GCTGG-3′。

③ PCR 扩增与产物纯化 PCR 反应采用 Promega 试剂盒，以蝎毒 cDNA 为模板，用引物 1 和其相反引物 SP6 进行双向扩增，反应条件为：94℃，45s；53℃，45s；70℃，1min；循环 30 次。PCR 产物经 6% PAGE 凝胶电泳检测，将扩增条带切出，浸泡回收。引物 2 和其相反的 T7 引物扩增时将退火温度升至 60℃，其他操作如上。

④ PCR 产物克隆、筛选及测序 引物 1 和引物 2 的 PCR 产物经 *Eco*R Ⅰ 和 *Bam* H Ⅰ 双酶切，分别装入 M13mp19 和 M13mp18 载体，转化 TG1 大肠杆菌，挑取阳性噬菌斑，小量抽提双链 DNA，双酶切检测插入片段，选择具有正常大小插入片段的单克隆，抽提单链 DNA，使用 Sequenase 试剂盒，α-^{32}P 标记，双脱氧末端终止法测序。

（3）结果

① 蝎毒 cDNA 文库的构建及抗哺乳动物毒素 cDNA 的筛选 从蝎尾腺分离

纯化 mRNA，逆转录得到的双链 cDNA，克隆在 pSPORT1 质粒的 T7 和 SP6 启动子之间。首先采用 N 端引物 1 和载体上已知的反向引物 SP6 进行 PCR 扩增，产物片段约 370bp（图 8-5），用 *Eco*R Ⅰ、*Bam* H Ⅰ 双酶切处理装入测序载体 M13mp19，经测序后，找到两个 BmK 抗哺乳动物毒素的 cDNA 基因片段。

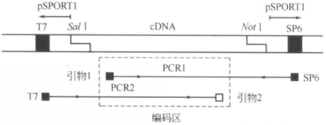


图 8-5　双链 cDNA 在载体 pSPORT1 上的 PCR 扩增示意图

根据所测的 cDNA 序列的同源性又合成了与两基因 3′端都完全互补的引物 2，相应于已知 BmK 抗哺乳动物毒素蛋白序列 C 端的保守区（2G2K2C2H2R2 终止子），其相反的引物则为载体上另一端的 T7 启动子。第二次 PCR 扩增产物约 270bp（图 8-5）。经纯化及双酶切后装入 M13mp18 载体测序，得到了两个完整的 cDNA 全序列（图 8-6）。所设计的引物 1 与已测定的序列相比较，只有一个碱基的差别（Asp23：GAC→GAT）。

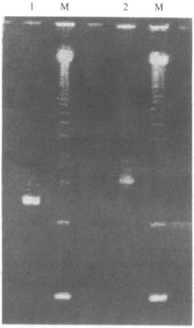


图 8-6　PCR 产物的电泳图谱
1—引物 2 和 T7 的 PCR 扩增产物；
2—引物 1 和 SP6 的 PCR 扩增产物；
M—123bp DNA ladder

② 钳蝎抗哺乳动物毒素的 cDNA 全序列　上述 cDNA 序列推导出的两个毒素前体被分别定名为 BmKM1 和 BmKM9。它们均有 84 个氨基酸残基，包括 N 端 19 肽的信号肽和 64 肽的成熟毒蛋白及两个紧邻的终止子之前编码的一个 Arg 残基（图 8-7）。

【附】 两个 BmK 抗哺乳动物毒素 cDNA的序列和 AaH、Lqh、Cn、Bj、Ts 抗哺乳动物毒素的 cDNA 情况相似。前体可分为三个部分。①N 端 1～19 残基的信号肽，它们符合信号肽的一般性质，富含疏水性氨基酸，有一个 Leu 丰富区，形成跨膜疏水性的 A 螺旋，信号肽酶切位点大多位于小分子残基 Ser。在已报道的 10 多个前体信号序列中无一例外，酶

切位点前 3 位残基均为 Val。②20～84 残基是 64 肽的成熟毒蛋白。③C 端有一个额外碱性残基 Arg，这在其他蝎毒的哺乳动物毒素中也可找到类似的例子，它们都是以一个或两个碱性氨基酸 Lys 或 Arg 结尾，在蛋白质后加工时这些残基被羧肽酶 B 类外肽酶所除去。

```
                                                                                      Y    L
BmK M1 ·······················································T TAT  TTG
BmK M9 CCACGCGTCG CTGCTGCTTT TCCAGAAAAT TCCTTAAAAC GATTCAAA ATG  AAT  TAT  TTG
                                                         M    N    Y    L
                 -10                                  -1
V   M   I   S   F   A   L   L   L   M   T   G   V   E   S   V   R   D   A   Y
GTA ATG ATC AGT TTT GCA CTT CTC CTA ATG ACA GGT GTG GAG AGT GTT CGG GAT GCT TAT
GTA ATG ATC AGT TTT GCA CTT CTC CTA ATG ACA GGT GTG GAG AGT GTT CGG GAT GCT TAT
V   M   I   S   F   A   L   L   L   M   T   G   V   E   S   V   R   D   A   Y
                10                                  20
I   A   K   P   H   N   C   V   Y   E   C   A   R   N   E   Y   C   N   D   L
ATT GCC AAG CCC CAT AAC TGT GTA TAC GAA TGT GCT AGA AAT GAA TAT TGC AAC GAT TTA
ATT GCC AAG CCC GAT AAC TGT GTA TAC CAT TGT GCT ACA AAT GAA GGT TGC AAC AAA TTA
I   A   K   P   E   N   C   V   Y   H   C   A   T   N   E   G   C   N   K   L
                30                                  40
C   T   K   N   G   A   K   S   G   Y   C   Q   W   V   G   K   Y   G   N   G
TGT ACC AAG AAT GGT GCT AAG AGT GGC TAT TGC CAA TGG GTA GGT AAA TAC GGA AAT GGC
TGT ACT GAC AAT GGT GCT GAG AGT GGC TAT TGC CAA TGG GGA GGT AGA TAT GGA AAT GCC
C   T   D   N   G   A   E   S   G   Y   C   Q   W   G   G   R   Y   G   N   A
                50                                  60
C   W   C   I   E   L   P   D   N   V   P   I   R   V   P   G   K   C   H   R
TGC TGG TGC ATA GAG TTG CCC GAT AAT GTA CCG ATT CGA GTA CCA GGA AAA TGC CAT CGT
TGC TGG TGC ATA AAG TTG CCC GAT AGA GTA CCG ATT AGA GTA CCA GGA AAA TGT CAT CGC
C   W   C   I   K   L   P   D   R   V   P   I   R   V   P   G   K   C   H   R

end end
TGA TAA TCCTGTAAAAAAA CATAAAGAATTGTAGTAAGAAGAACTATAAATAAA TATAT AATAAT(A)n
TGA TAA ACCTGT AAAATTAAAACATAAAGAATTGTCGTAAGAAGAACTA TAAATAAA TATAAA TAA TAAAATTGC(A)n
end end
```

图 8-7　东亚钳蝎抗哺乳动物毒素的 cDNA 和前体的推导序列

用化学方法测定全序列的 BmK 抗哺乳动物毒素很少（图 8-8）。上述由 cDNA推导出的两个全序列与之比较可以发现，其一与天然 BmK1 的蛋白测序结果完全相同。另一序列 BmKM9 与蛋白测序所得的天然 BmKM4 非常相近，其间仅有 2 个残基的天然突变：第 18 位的 Gly→Thr 和第 54 位的 Asp→Arg。天然 BmKM4 的蛋白组分不同于一般具有高等电点（pH9 以上）的碱性组分（如 BmK1，BmK2，BmK3），其等电点接近中性 pH7.6。但它的毒性较之于碱性组

分的毒性降低 5～8 倍。显然，毒性的降低与荷电残基的突变相关。由 BmKM9 基因所编码蛋白的性质在基本的方面与天然的 BmKM4 相近，其第 54 位的残基由酸性变为碱性（D→R，见图 8-8），可能对其等电点和毒性产生影响。因此，将 BmKM9 基因进行表达，并测定表达产物的生物活性及其他生化性质，将可能提供新的结构与功能关系信息。

```
                    10        20        30        40        50        60
BmK1/M1  VRDAYIAKPHNCVYECARNEYCNDLCTKNGAKSGYCQWVGKYGNGCWCIELPDNVPIRVPGKCH
BmK 2    VRDAYIAKPHNCVYECARNEYCNDLCTKDGAKSGYCQWVGKYGNGCWCIELPDNVPIRIPGNCH
BmK 3    VRDAYIAKPENCVYECATNEYCNKLCTDNGAESGYCQWVGRYGNACYCIKLPDRVPIRIWGNCHG
BmK M8   GRDAYIADSENCTYFCGSNPYCNDVCTENGAESGYCQWAGRYGNACYCIDLPASERIKEGGRCG
BmK M4   VRDAYIAKPENCVYHCAGNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPLDVPIRIWGNCH
BmK M9   VRDAYIAKPENCVYHCATNEGCNKLCTDNGAESGYCQWGGRYGNACWCIKLPDRVPIRVPGKCH
```

图 8-8 具天然抗神经毒特性的东亚钳蝎 M1 和 M9 的氨基酸序列比较

（阴影或方框内者为同源性质的部分）

BmK 与同一亚科的 Lqh、AaH 抗哺乳动物毒素的同源性较强，且基因的同源性要高于所编码蛋白的同源性，如 BmKM1 与 Lqh AIT 基因序列同源性达 87.2%，与 AaH1、AaH3 的基因序列同源性达 75.1%；而与 Lqh AIT 的蛋白序列同源性为 82.8%，与 AaH1 的蛋白序列同源性为 50%多。

3. 眼镜蛇

【来源】 本品为眼镜蛇科动物眼镜蛇［*Naja naja*（Linnaeus).］除去内脏的干燥全体。

【毒腺 cDNA 文库构建】

（1）试剂 poly（A）Ttract Series9600™ mRNA Isolation System 试剂盒，Universal RiboClone cDNA Synthesis System 试剂盒，Packagene Lambda DNA Packaging System 试剂盒等。

受体菌和克隆载体：λgt10 *Eco*R Ⅰ arms，λgt10 测序引物，大肠杆菌 C600 菌、C600 hlf 菌等。

（2）方法

① 眼镜蛇毒腺诱导 取活眼镜蛇，挤出毒液 3 天后，断头处死，取出毒腺，置液氮中，以备提取总 RNA。

② 毒腺总 RNA 提取 眼镜蛇毒腺总 RNA 采用异硫氰酸胍一步法提取。取出液氮中保存的毒腺，切取毒腺组织 1g，置于研钵内，冷冻状态研磨 2min 至粉末状，待液氮挥发后，加入 10mL 变性液 D（4mol/L 异硫氢酸胍；25mmol/L 柠檬酸钠，pH 值 7.0；0.5% SLS；0.1mol β-巯基乙醇），再置于匀浆器中匀浆，

然后置 50mL 离心管中，再依次加入 1mL 2mol/L 乙酸钠，pH4.0；10mL 饱和酚；2mL 氯仿-异戊醇（49∶1）。每一步均需让溶液颠倒充分混合，剧烈振荡 10s 后冰浴 15min。40℃离心 20min（10000r/min）。离心后取上层水相，加入等体积冰乙醇，−20℃沉淀 RNA 至少 1h。沉淀溶于 3mL 变性液 D 中，加入 2 倍体积乙醇，−200℃1h，再沉淀 RNA。沉淀用 75%乙醇洗 3 次沉淀干燥 15min 后，溶于一定体积的无酶水中。经 1%的琼脂糖凝胶电泳，观察 RNA，并用紫外分光光度计测定 RNA 纯度。

③ mRNA 的提取　用 poly（A）Ttract Series9600™ mRNA Isolation System 试剂盒，将 500μg 总 RNA 与生物素化的 oligo（dT）退火，然后用亲和素磁性珠捕捉 poly（A）mRNA，用无酶水洗脱 mRNA，再加入 3mol/L 醋酸钠（pH7.0）和等体积异丙醇沉淀浓缩，取 1μL 点在含 1%EB 的琼脂板上，估计得量。

④ cDNA 合成　基本按 Promega 的 Universal Ribo Clone cDNA Synthesis System 试剂盒操作。取 2μg mRNA，1μg oligo（dT）引物，加无酶水至 15μL，70℃浴 10min 变性，cDNA 第一链和第二链的合成按试剂盒手册操作。

⑤ cDNA 片段的克隆和体外包装　合成的 cDNA 经 SephcrylS-400 旋转柱，去除小于 300bp 的小分子 cDNA。将大分子 cDNA 与 *Eco*R Ⅰ衔接子连接，再与噬菌体 λgt10 的 *Eco*R Ⅰ的酶切臂连接，获得重组的噬菌体 λgt10。将重组噬菌体用 Packagene Lambda DNA Packaging System 试剂盒进行体外包装。

⑥ cDNA 库的平板鉴定　将噬菌体 cDNA 包装物，作 1/100、1/1000、1/10000稀释，取 100μL 稀释液和 100μL 对数生长期的 C600 hlf 细菌混合，37℃吸附 30min，在 LB 平板上，与 TB 上层琼脂混合铺板，37℃培养过夜，第 2 天计算平皿上的透明斑。非重组噬菌体在 C600 hlf 中不能生长，只有重组噬菌体可在 C600 hlf 中生长并形成透明斑。根据透明斑的数目计算噬菌体滴度，公式为：噬菌体滴度（pfu/mL）＝透明噬斑数×稀释倍数×10。库容量为库包装体积×滴度。眼镜蛇毒腺 cDNA 文库的保存：将眼镜蛇 cDNA 文库在 C600 hlf 中于 LB 培养基上扩增，每个 90mm 平皿上铺10000个噬菌斑，37℃培养至菌斑长成针尖大小，用 TMG 缓冲液洗脱噬菌斑，分别与等体积甘油混合保存于−700℃。

⑦ cDNA 的 PCR 快速鉴定　直接挑取菌斑，在 30μL 中加入 3μL 1×PCR 缓冲液、2.4μL 2mmol/L dNTP、2.4μL 25mmol/L $MgCl_2$、1U Taq 酶、λgt10 上下游测序引物各 10pmol/L，95℃ 5min 预变性；再 94℃ 30s，55℃ 30s，72℃ 2min，35 个循环，72℃ 7min。1%琼脂糖凝胶电泳检测。

（3）结果　见图 8-9、图 8-10。

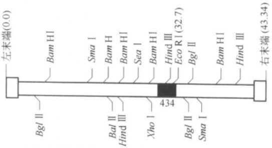


图 8-9 噬菌体 λgt10 的 *Eco*RⅠ的消化位点示意图

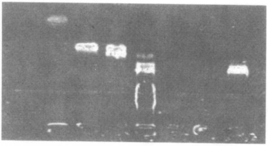


图 8-10 cDNA 文库的 PCR 扩增产物电泳图谱

1—菌体混浊斑（非重组噬菌体）PCR 扩增产物，82bp；2,3,5,6,7—噬菌体透明斑 PCR 扩增产物；4—λDNA *Eco*R Ⅰ和 *Hin*d Ⅲ marker

【附】

① 眼镜蛇总 RNA 的质量。用一步法从眼镜蛇毒腺 1g 组织中提取了 1.2mg 总 RNA，$OD_{260}/OD_{280}=2.0$，满足纯度要求。取 10μg RNA 进行琼脂糖凝胶电泳，可见清晰的核糖体 RNA（rRNA）带，且无降解。获得的 mRNA 通过斑点检测也无降解现象。

② cDNA 文库的构建及平板鉴定。由于 cDNA 的接头是单一的 *Eco*RⅠ接头，重组入噬菌体 λgt10 的 *Eco*RⅠ酶切位点（图 8-9）。除重组噬菌体外，也存在着自身连接的非重组噬菌体。非重组噬菌体不能在 C600 hlf 菌中生长，在 C600 菌中形成混浊斑；重组噬菌体在 C600 菌和 C600 hlf 菌中均形成透明斑，因而据此可推算出重组率。经 C600 菌和 C600 hlf 菌株平皿测定，重组率为 70%，达到建库要求，克隆的眼镜蛇 cDNA 文库的库容量为 2×10^6。

③ cDNA 文库的 PCR 鉴定。随机挑取 5 个透明斑，PCR 扩增均有大于 500bp 的插入片段（图 8-10），表明已成功地获得了眼镜蛇毒腺 cDNA 的重组噬菌体。

【血清解毒蛋白 cDNA 文库构建】

（1）试剂　cDNA 合成试剂、λgt10 克隆药盒及［α-^{32}P］dATP、［α-^{32}P］dCTP 和［α-^{35}S］dATP（Amersham 公司），各种限制性内切酶等。

（2）方法

① 蛇肝 mRNA 的分离　成年中华眼镜蛇剪颈放血后取出肝脏立即置液氮中冰冻，冰冻干燥后短时间储存于－20℃，用于制取 RNA。0.05g 干燥的蛇肝组织悬浮于 1mL 4mol/L 异硫氰酸胍中，加入 4mL 巯基乙醇于低温捣碎。总 RNA 微量快速制备按 Han 描述的方法完成。然后进一步用 DYNAL 寡聚 dT 磁性珠从总 RNA 中分离制得 mRNA。

② cDNA 的合成和克隆　2μg 蛇肝 mRNA 用于 cDNA 第一链的合成，寡聚 dT 作为合成引物。第二链的合成用 mRNA/cDNA 杂交体作为底物，经 *E. coli* 核糖核酸酶 H 链内水解 mRNA 产生多重缺口，为 *E. coli* DNA 聚合酶Ⅰ的作用提供有效引物。制得的 cDNA 经纯化后与脱磷酸的 *Eco*RⅠ接头连接，然后用柱层析纯化去除小于 0.5kb 的 DNA 片段。如此得到的 cDNA 经磷酸化后再与 λgt10 臂连接。最后 λgt10 重组体经体外包装后完成 cDNA 文库的制备。大肠杆菌宿主 NM514（γ^- m^+）用于 λgt10 重组体的转染和文库扩增。文库质量通过用 *Eco*RⅠ或 *Bam*HⅠ酶切重组体，将插入片段用［α-^{32}P］dCTP 标记后作电泳和放射自显影进行分析。

③ 聚合酶链反应（PCR）和杂交探针的制备　用上述制得的 cDNA λgt10 文库或泰国眼镜蛇 cDNA λgt11 文库直接作为 DNA 模板，通过 PCR 方法制备杂交探针。引物按照 CSAP 两个已知小肽段的氨基酸序列设计，其密码选择参照 Fritzinger 等报道的眼镜蛇 C_3 补体蛋白基因密码频率。

PCR 执行 35 个循环，变性步骤 95℃（1min），延伸步骤 72℃（3min），退火步骤根据不同引物分别使用 40℃、45℃、50℃、52℃、55℃或 58℃（各 1min）。

PCR 反应液组成为：dNTP（每种 200μmol/L），寡核苷酸引物（每种 50pmol/L），反应缓冲液（$MgCl_2$ 0.145mmol/L，Tris-HCl 20mmol/L，pH8.4；KCl50mmol/L）。

循环开始前，将 1μL cDNA 文库加入 PCR 混合液中，于 72℃保温 12min，立即置冰浴中冷却以变性噬菌体。加 2.5U Taq 聚合酶，总反应体积为 50μL。为鉴定 PCR 产物作为杂交探针的特异性，进一步根据小肽段序列设计内引物，原 PCR 产物经电泳洗脱法纯化后再作为 DNA 模板重新执行 PCR。根据第二次 PCR 产物的有无及分子量大小以确定特异性，用于文库筛选。

④ 从筛选 cDNA 文库特异性克隆特异 PCR 产物　用［α-^{32}P］dATP 通过随

机引物法进行标记。以此为探针进行原位杂交，筛选阳性噬菌斑。预杂交、杂交和洗涤温度均为 65℃。挑取阳性噬菌斑后，通过特异性引物和 λgt 通用引物的 PCR，以及 *Eco*R Ⅰ酶切 λgt 重组体分析插入肽段大小，进一步验证阳性克隆的特异性。

⑤ 亚克隆和 DNA 序列分析　特异性克隆经琼脂平板扩增后，制取 λgt DNA 重组体，后者用 *Eco*R Ⅰ水解，所得插入片段经电泳洗脱纯化后，与预经 *Eco*R Ⅰ酶切线性化的脱磷酸的质粒 pBluscript Sk phagemid 连接重组。*E. coli* 宿主 XL-1 Blue 被用于重组体的转化。含插入片段的阳性亚克隆用互补到质粒 *Eco*R Ⅰ切口两端的通用引物（T3，T4）及特异性引物执行 PCR 而筛选和确认。如此得到的阳性亚克隆经质粒微量制备法纯化后直接用作序列分析模板。

DNA 序列分析采用双脱氧链末端终止法，按 Sequenase Version 2.0 Sequencing Kit 的说明操作。质粒通过引物（T3、T4、SK、KS）作为序列分析引物，从插入片段的两端起始向内侧作序列分析。根据测得的序列再合成新的引物，直至完成全长 cDNA 序列的测定。每部分序列至少被重复测定 2 次，以确保结果无误。

（3）结果

① cDNA 文库的质量分析　构建的蛇肝 cDNA λgt10 文库含有 7×10^5 个原始克隆，其滴度为 1.4×10^6 pfu/mL，扣除重组本底后得到的文库重组体表现百分率为 95%。此结果表明该文库具备使用价值。进一步用酶切法分析 30 个任意挑取的克隆，发现其实际重组体百分率为 40%，平均插入肽段长度为 0.7kb。用 λgt10 通过引物对该文库进行 PCR 分析，也得到近似的结果。尽管在重组实验之前已排除小肽段 cDNA，但该结果说明分子量相对较小的 cDNA 肽段仍已被优先克隆。其原因与使用不够新鲜的蛇肝 mRNA 制备材料有关。考虑到 CSAP 的 cDNA 全长应大于 2kb，估计该文库对其筛选较为困难，故除用于制备探针外，以后的筛选工作主要使用蛇肝 cDNA λgt11 文库。

② PCR 引物的设计和特异性杂交探针的制备及鉴定　用于制备特异性探针的 PCR 引物设计是实验中关键的一步。已知的 CSAP 氨基酸序列仅为胰蛋白酶水解后纯化的 6 个小寡肽段（表 8-2），且不知其前后顺序。本研究根据其中 2 个最长的肽段（No.1 与 No.2）的部分氨基酸序列设计了 2 对 PCR 引物，其方向互为相向［表 8-3（a）］。又根据 No.1 和 No.2 肽段设计了 2 个引物，分别为前 2 对引物的内引物［表 8-3（b）］。所得结果的正确性被最后的序列分析结果所证实（图 8-11）。根据肽段所设计的这 6 个 PCR 引物，推测的碱基序列与最后实际所见到的序列作比较，正确率均在 82%。

表 8-2　眼镜蛇血清解毒蛋白（CSAP）已测定序列的胰蛋白酶水解肽段

No.	
1	10　10　30 H₂N—TSSTGTISPFVHPNAEE AXQAFQND RD(S)VLAQYIFXL(S)R—COOH
2	10　20　30 H₂N—LASQIS ATDFGAIT LTL VTQTVPXATLEDL(K)—COOH
3	10 H₂N—HVDDQHSTIR—COOH
4	H₂N—NHPELSK—COOH
5	H₂N—FIETHEK—COOH
6	H₂N—FVNAK—COOH

注：实线：表示设计的引物；点线：表示设计的内引物。

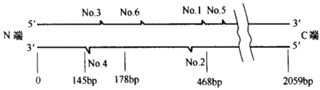


图 8-11　所设计的引物在 CSAP cDNA 序列中的位置

表 8-3　设计的 PCR 引物

(a)	F V H P N A E E
	No. 1　5'-TTTGTGCATCCCAATGCTGAAGA-3'
	No. 2　3'-AAACACGTAGGGTTACGACTTCT-5'
	A T D F G A I T
	No. 3　5'-GCCACTGACTTTGGAGCCATTAC-3'
	No. 4　3'-CGGTGACTGAAACCTCGGTAATG-5'
(b)	Q A F Q N D
	No. 5　5'-CAGGCATTCCAGAATGA-3'
	V T Q T V P
	No. 6　5'-GTGACTCAGACTGTGCC-3'

注：引物对：No. 1-No. 4，No. 2-No. 3，No. 5-No. 4（No. 1-No. 4 扩增产物作为模板）和 No. 6-No. 2（No. 2-No. 3 扩增产物作为模板）。

③ 重组体的筛选和鉴定　特异性探针标记后对肝细胞 cDNA λgt11 文库作杂交筛选，在密度为 2000 克隆/平板的水平上得到 15～18 个较强的杂交信号。挑取其中 3 个杂交斑在连续的低密度平板上作进一步的杂交分离。最后对这 3 个阳性克隆用 λgt11 通用引物对（位于 λgt11 双臂的两端）和 No. 2 和 No. 3 引物对做 PCR 验证。结果其中 2 个克隆在作为模板时能产生正确的 PCR 产物。进一步对此 2 个克隆作 *Eco*R Ⅰ 酶切分析，均检测到 2.1kb 左右的插入片段，从而被

确认为特异性 CSAP 的 cDNA 克隆。

④ 眼镜蛇解毒蛋白 cDNA 全长序列　特异性克隆的插入片段经酶切后被进一步亚克隆，然后作序列测定。CSAP 的 cDNA 全长序列共由 2059bp 组成，其中含有 1 个 1842bp 的开放阅读框架，共编码 614 个氨基酸残基（图 8-12）。该 cDNA 的 3′-末端有 1 个 197bp 的不翻译区，其中包括最末端的由 13 个腺苷酸组成的多聚 A 尾端。在 5′-末端起始密码（ATG）之前有一段由 19bp 组成的非编码前导序列。该 cDNA 中，其第 1～91bp 序列与人血清白蛋白（HSA）的 mRNA 中编码成熟白蛋白之前的第 1～91bp 序列相比较，有 55％的相同性。从而推

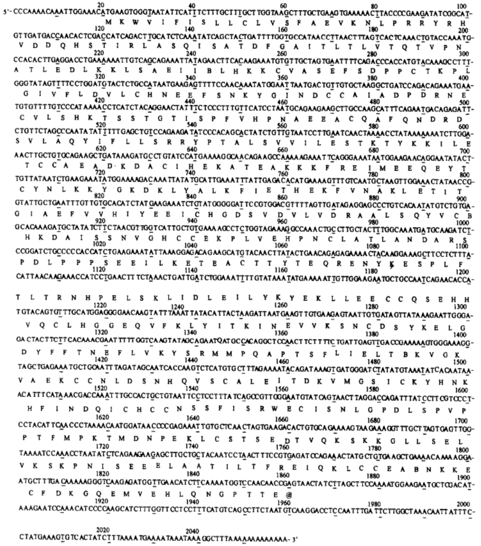


图 8-12　CSAP 的 cDNA 序列和相应的氨基酸残基序列

测从起始密码起第 20～91bp 所编码的氨基酸序列为 CSAP 的信号肽（前导肽），其第 86～91bp 所编码的 2 个相连精氨酸残基通常是哺乳动物血清白蛋白前导肽末端的一个重要特征。比较 CSAP 与 HSA 的密码使用频率（表 8-4），二者差距并不太大，但前者基因中 G+C 组成率较低（3700），为眼镜蛇密码使用的一个重要特征。此外，从 CSAP 的 cDNA 所编码的全长氨基酸顺序中，既往从 CSAP 经酶切纯化所得的 6 个小肽段的位置也全部被确定，所有氨基酸残基（共计 99 个）完全相符。这表明中华眼镜蛇和泰国眼镜蛇 CSAP 很可能是同一种分子，或者差异甚微。

表 8-4　CSAP 与人血清白蛋白密码使用频率的比较

氨基酸	密码	CSAP	HSA	氨基酸	密码	CSAP	HSA
Gly	GGG	0.11	0.13	Trp	UGG	1.00	1.00
Gly	GGA	0.50	0.43	End	UGA	0.00	0.00
Gly	GGU	0.39	0.22	Cys	UGU	0.56	0.43
Gly	GGC	0.00	0.00	Cys	UGC	0.44	0.59
Glu	GAG	0.23	0.38	End	UAG	0.00	0.00
Glu	GAA	0.77	0.62	End	UAA	1.00	1.00
Asp	GAU	0.60	0.69	Tyr	UAU	0.90	0.68
Asp	GAC	0.40	0.31	Tyr	UAC	0.10	0.32
Val	GUG	0.21	0.37	Leu	UUG	0.32	0.20
Val	GUA	0.26	0.19	Leu	UUA	0.25	0.15
Val	GUU	0.35	0.28	Phe	UUU	0.60	0.71
Val	GUC	0.18	0.16	Phe	UUC	0.40	0.29
Ala	GCG	0.00	0.04	Ser	UCG	0.02	0.11
Ala	GCA	0.34	0.25	Ser	UCA	0.23	0.21
Ala	GCU	0.49	0.49	Ser	UCU	0.30	0.11
Ala	GCC	0.17	0.22	Ser	UCC	0.18	0.25
Arg	AGG	0.11	0.18	Arg	CGG	0.06	0.08
Arg	AGA	0.66	0.48	Arg	CGA	0.06	0.11
Ser	AGU	0.16	0.21	Arg	CGU	0.11	0.11
Ser	AGC	0.11	0.11	Arg	CGC	0.00	0.04
Lys	AAG	0.36	0.33	Gln	CAG	0.39	0.45
Lys	AAA	0.64	0.67	Gln	CAA	0.06	0.11
Asn	AAU	0.60	0.65	His	CAU	0.60	0.69
Asn	AAC	0.40	0.35	His	CAC	0.40	0.31
Met	AUG	1.00	1.00	Leu	CUG	0.16	0.19
Ile	AUA	0.32	0.12	Leu	CUA	0.08	0.05
Ile	AUU	0.32	0.44	Leu	CUU	0.16	0.30
Ile	AUC	0.36	0.44	Leu	CUC	0.03	0.11
Thr	ACG	0.00	0.07	Pro	CCG	0.04	0.04
Thr	ACA	0.41	0.38	Pro	CCA	0.44	0.29
Thr	ACU	0.39	0.24	Pro	CCU	0.32	0.42
Thr	ACC	0.20	0.31	Pro	CCC	0.20	0.25

⑤ CSAP与哺乳动物血清白蛋白的同源性　CSAP分子全长由614个氨基酸残基组成，相对分子质量为69800。CSAP与数种已知的哺乳动物前体血清白蛋白（prepro-albumin）由605～609个氨基酸残基组成，相对分子质量在67000～69000之间，十分近似。

将CSAP分子全长序列与人前体血清白蛋白序列作比较，二者具有32%的同源性。其次，CSAP的信号肽序列与非常保守的已知几种哺乳动物血清白蛋白的信号肽几乎相一致（表8-5）。尤其值得一提的是CSAP中的34个半胱氨酸残基及其在全序列中的分布规律，也与已知的几种哺乳动物白蛋白只有很小差别。由此决定了其巯基经氧化后生成的二硫键对肽链的回折在构建白蛋白分子的空间结构中的特征性。此外，已有研究表明，眼镜蛇血清能中和毒素的量与血清白蛋白含量相关，呈当量关系。

表8-5　CSAP的信号肽与若干哺乳动物血清白蛋白信号肽的比较

CSAP	MKWVIFISLLCLVSFAEVKNLPRR	Sheep SA	MKWVTFISLLLLFSSAYSRGVFRR
Human SA	MKWVTFISLLFLFSSAYSRGVFRR	Pig SA	WVTFISLLFLFSSAYSRGVFRR
Bovine SA	MKWVTFISLLLLFSSAYSRGVFRR	Rat SA	MKWVTFLLLLFISGSAFSRGVFRR

4. 大黄

【来源】本品为蓼科植物掌叶大黄（*Rheum palmatum* L.）、唐古特大黄（*R. tanguticum* Maxim. et Balf.）或药用大黄（*R. officinale* Baill.）的干燥根及根茎。

【rRNA基因间隔区序列测定】

（1）材料　掌叶大黄（*Rheum palmatum* L.）的种子。

（2）仪器　PE-24000 PCR仪（美国），PCR测序仪（AB1377测序仪，美国AB公司）等。

（3）方法

① DNA提取　将样品于特制的铁质研钵内研碎。研体使用前在酒精灯火焰上烤30s，以防DNA污染。取少许粉碎物移入0.5mL离心管内，加蒸馏水50μL，置55℃水浴1h，加100μL，400μL/mL蛋白酶K溶液（为0.5%非离子去污剂NP40配制），置55℃水浴消化3h，然后改置95℃水浴灭活蛋白酶K10min。加40μL水，饱和的Chelex100树脂吸附金属离子，置55℃水浴20min，然后离心30s（10000r/min），取其上清液作为PCR扩增之模板。

② 引物设计　5条寡核苷酸引物，序列如下。

ITS1P-P1：5-GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G。

ITS1P1：5-TCC GTA GGT GAA CCT GCG GA。

ITS1P2：5-GCT GCG TTC TTCATC GAT GC。

ITS2P1：5-GCA TCG ATGAAG AAG GCA GC。

ITS2P2：5-TCC TCC GCTTAT TGA TAT GC。

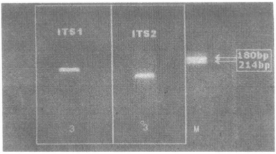
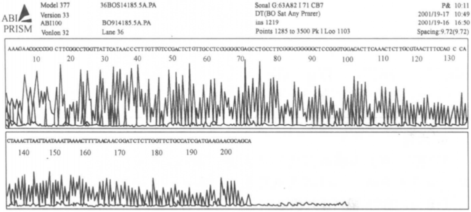
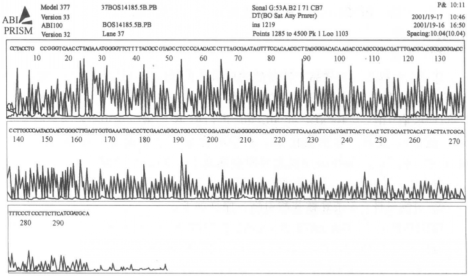


图 8-13　大黄 rRNA 基因 *n*PCR 产物电泳图谱



(a) ITS1正向测序结果



(b) ITS2反向测序结果

图 8-14　大黄种子 rRNA 基因内转录间隔区碱基序列图

③ 扩增策略。先用引物 ITS1P-P1 和 ITS2P2 扩增 rRNA 基因内转录间隔区全序列；产物经纯水稀释后，分别由引物 ITS1P1 和 ITS1P2、ITS2P1 和 ITS2P2 扩增第 1 和第 2 间隔区。由此完成套叠式聚合酶链反应。

④ 扩增体系参数　优化后的扩增体系为上、下游引物各 0.5μmol/L，dNTP 各 200μmol/L，KCl 10mmol/L，$(NH_4)_2SO_4$ 8mmol/L，$MgCl_2$ 2mmol/L，Tris-HCl (pH9.0) 10mmol/L，NP40 0.5%，Taq DNA 聚合酶 1U。总反应体积 20μL，其中模板液 5μL。ITS1P-P1 和 ITS2P2 扩增为吸取 DNA 提取液 5μL 为模板；ITS1P1 和 ITS1P2、ITS2P1 和 ITS2P2 则为将 ITS1P-P1 和 ITS2P2 扩增产物经纯水稀释 10 倍后吸取 5μL 为模板。热循环参数均为 93℃ 预变性 2min，然后按 93℃ 30s，55℃ 30s，72℃ 60s，共循环 35 个周期。最后一个周期 72℃ 延长至 5min。

⑤ PCR 扩增产物电泳　将经 *n*PCR 后的模板在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳，已确定大黄种子 rRNA 基因第 1 和第 2 内转录间隔区 *n*PCR 扩增产物的存在。

⑥ DNA 碱基序列测定　乙醇纯化 ITS1P1 和 ITS1P2 扩增产物与 ITS2P1 和 ITS2P2 扩增产物。前者用 ITS1P1 引物作正向测序，后者用 ITS2P2 引物作反向测序。

(4) 结果　见图 8-13、图 8-14、图 8-15。

5′-ACAAGAACGC CCGGGCTTCG GCCTGGTTAT TCATAACCCT TTGTTGTCCG
ACTCTGTTGC CTCCGGGGCG ACCCTGCCTT CGGGCGGGGG CTCCGGGTGG
ACACTTCAAA CTCTTGCGTA ACTTTGCAGT CTGAGTAAAC TTAATTAATA
AATTAAAACT TTTAACAACG GATCTCTTGG TTCTGGCATC GATGAAGAAC
GCAGCA——TGCATCGAT GAAGAACGCA GCGAAATGCG ATAAGTAATG
TGAATTGCAG AATTCAGTGA ATCATCGAAT CTTTGAACGC ACATTGCGCC
CCCTGGTATT CCGGGGGGCA TGCCTGTTCG AGCGTCATTT CACCACTCAA
GCCTCGCTTG GTATTGGGCA ACGCGGTCCG CCGCGTGCCT CAAATCGTCC
GGCTGGGTCT TCTGTCCCCT AAGCGTTGTG GAAACTATTC GCTAAAGGGT
GTTCGGGAGG CTACGCCGTA AAACAACCCC ATTTCTAAGG TTGACCTCGG
ATCAGGTGG-3′

图 8-15　大黄种子 rRNA 基因内转录间隔区碱基完整序列图

（下划线位置为 ITS1 正向测序、ITS2 反向测序结果拼接处）

【附】 利用真核细胞中 18S～5.8S～28S rRNA 基因的保守区序列，自行设计引物扩增由 18S～5.8S 间的第 1 间隔区和 5.8S～28S 间的第 2 间隔区。经琼脂糖凝胶电泳获得了大黄种子 rRNA 基因的第 1 间隔区和第 2 间隔区的清晰、明亮的扩增条带。并完成了该 2 个间隔区扩增产物的 DNA 碱基序列的测定。引物 ITS1P2 和引物 ITS1P1 为互补的等位基因，对第 1 间隔区和第 2 间隔区分别进行正向测序和反向测序，并将两段序列进行拼接以获得大黄种子 rRNA 基因内

转录间隔区的完整碱基序列。

5. 杜仲

【来源】 本品为杜仲科植物杜仲（*Eucommia ulmoides* Oliv.）的干燥树皮。

【25S rDNA 5′端序列分析】

（1）方法　模板 DNA 的制备及 rDNA 特定区域的 PCR 扩增。采用 CTAB 法和丙酮醋酸钾法提取总 DNA，rDNA PCR 扩增产物的克隆及序列测定。

（2）结果　见图 8-16、图 8-17、图 8-18。

【附】

① PCR 扩增结果片段长度约 1.0kb，包括基因间隔区（ITS 区）及 25S rDNA 5′端在内的 LH2/Dlc 片段。

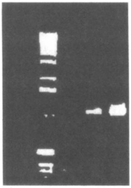


图 8-16　rDNA PCR 扩增结果

0—空白对照；M—1kb 分子质量标准；1～3—PCR 扩增产物（1，2—CTAB 法；3—丙酮醋酸钾法）

② 采用计算机分析软件 PcBene 6.0 将所获得的序列与 8 种植物（*Rohdea japonica*，Zea May）同源序列进行排列，比较结果发现在所有比较的类群中，在某些相对保守的位点上，杜仲核苷酸发生突变，如 115 位的核苷酸，其他植物为 C，而杜仲为 T；118 位点和 119 位点上，所有比较的植物都为 GA，仅杜仲例外，为 TT。

```
                  C1 区域
    TGCGACCCCA GGTCAGGCGG GACTACCCGC TGAGTTTAAG CATATCAATA AGCGGAGGAA  60
    AAGAAACTTA CAAGGATTCC CCTAGTAACG GCGAGCGAAC CGGGAAGAGC CCAGTTTTTT 120
    AATCGGGCGG CCACGCCGTT CGAATTGTAG TCTGGAGAAG CGTCCTCAGC GGCGGACCGG 180
    GCCCAAGTCC CCTGGAATGG GGCGCCGGAG AGGGTGAGAG CCCCGTCGTG CCCGGACCCT 240
D1  GTCGCACCAC GAGGCGCTGT CGACGAGTCG GGTTGTTTGG GAATGCAGCC CCAATAGGGC 300
    GGTAAATTCC GTCCAAGGCT AAATACGGGC GAGAG              C2 区域       360
```

图 8-17　杜仲 25S rDNA 5′端序列

	111　　120
Eucommia sp.	CCAG**T**TT**TT**T
Hamamelis sp.	CCAG**C**TT**GA**A
Quercus sp.	CCAG**C**TT**GA**G
Tetracentron sp.	CCAG**C**TT**GA**G
Euptelea sp.	CTAG**C**TT**GA**G
Rohdea sp.	CCAG**C**TT**GA**A
Zea sp.	CCAG**C**TT**GA**G

图 8-18　杜仲 25S rDNA 5′端序列中的突变位点（黑体字所示）

6. 葛根素

【来源】 本品为豆科植物野葛［*Pueraria lobata*（Willd.）Ohwi］或甘葛藤（*Pueraria thomsonii* Benth.）干燥根的主要成分之一（葛根素，Puerarin）。

【基因差异表达分析】

（1）材料　平滑肌细胞，葛根素。

（2）方法　应用葛根素体外诱导兔血管平滑肌细胞凋亡模型和 mRNA 差异显示技术观察葛根素诱导与正常细胞间基因差异表达，将葛根素作用后高表达的 cDNA 片段克隆、测序，与 GeneBank 进行同源性分析，并用 P 标记探针，再与不同浓度葛根素作用的血管平滑肌细胞总 RNA 进行 Northern 印迹分析。

① 兔主动脉平滑肌细胞凋亡模型的建立　取体重 1.5～2.0kg 雄性新西兰兔，无菌条件下取出胸主动脉，剥离中膜，组织贴块法在含 20%胎牛血清的 IMDM 培养基中体外原代及传代培养。应用鼠抗人，肌动蛋白单克隆抗体和 SP 免疫组织化学试剂盒检测细胞内抗体以证实为平滑肌细胞。取第 4 代细胞，每瓶 2×10^5 细胞中加入葛根素，终浓度分别为 10^{-5}mol/L、10^{-6}mol/L 和 10^{-7}mol/L 继续培养 48h，同时设空白对照组。

用 FAC420 流式细胞仪检测细胞凋亡率，细胞周期峰低于 G_1 期 DNA 含量的细胞为凋亡细胞。细胞滴片，荧光显微镜观察凋亡细胞数并拍照；铀、铅双重染色，透射电镜观察细胞核内结构变化和凋亡小体。

② 样品总 RNA 的提取及鉴定　用 Trizof 试剂分别提取葛根素诱导和正常细胞总 RNA，用甲醛变性凝胶电泳检测 RNA 的完整性，紫外分光光度计测定样品 A_{260}/A_{280} 值。

③ 引物设计及荧光差异显示　参照 GENOMYX 的“HIEROGLYPHTM Preamplifi-cation System”试剂盒，设计上游随机引物为：M 3 r ARP9 5′-ACA ATT TCA CAC AGG ATA AGA CTA GCS-3′；M 3 r ARP10 5′-ACA ATT TCA CAC AGG AGA TCT CAG AC-3′；M 3 r ARP11 5′-ACA ATT TCA CAC AGG AA（iCT AGT GT-3′）；M 3 r ARP12 5′-ACA ATT TCA CAC AGG AGG TAC TAA GG-3′。下游锚定引物为：T7（DTI 2）AP2 5′-ACG ACT CAC TATAGG GC T TTT TTT TTT TT CG-3′；（DTI 2）AP3 5′-ACG ACT-CAC TAT AGG GC T TTT TTT TIT TT CG-3′；（DTI 2）AP7 5′-ACG ACT CAC TAT AGG6（T TIT TIT TIT TT CG-3′）；T7（DTI 2）AP9 5′-ACG ACT CAC TAT AGG GC T TIT TIT TITTIA(L-3′)。

应用锚定引物 T（AP2、AP3、AP7 和 AP9）分别反转录合成 cDNA 一链，然后再分别与 4 条随机引物作 16 种组合进行同步 PCR 扩增，荧光标记，在热循环仪中合成二链 cDNA 模板。反应条件为：94℃ 30s，60℃ 30s，72℃ 2min，40 个循环，72℃延伸 7min。产物用 6%变性聚丙烯酰胺凝胶进行恒功率电泳，4h

后显示比较差异条带。

④ 回收差异区带及克隆测序　切下含葛根素作用后出现明显上调 cDNA 片段的凝胶，将 cDNA 片段纯化作为模板，分别以回收片段对应的 3′锚定引物与 5′随机引物作再扩增，产物纯化后与 pGEN＋T Easy 载体连接，转染 JM109 感受态细胞，*Eco*R Ⅰ酶切鉴定，以证明克隆片段与扩增产物片段大小一致。筛选出阳性克隆产物用 Taq 酶荧光标记引物循环测序法测序。将 CENA 序列与 NRY 和 EST 信息库资料进行同源性比较。

⑤ Northern 印迹分析　在培养的兔主动脉 SMC 中加入葛根素，终浓度分别为 10^{-5} mol/L、10^{-6} mol/L 和 10^{-7} mol/L，同时设空白对照组，共同培养 48h。提取细胞总 RNA，稀甘油醛磷酸脱氢酶（GAPDH）为内对照，1%甲醛变性的琼脂糖凝胶电泳，用标准毛细管印迹技术转染 RNA 至硝酸纤维素膜。快速杂交液于 68℃预杂交约 30min，用随机引物法^{32}P 标记回收的 cDNA 片段 41 为探针，68℃杂交 1h，洗膜 5 次，放射自显影，灰度扫描半定量分析其对应基因在葛根素作用细胞中的表达。

（3）结果

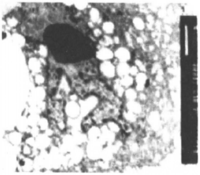
① 葛根素作用后细胞凋亡的变化　10^{-5} mol/L、10^{-6} mol/L 和 10^{-7} mol/L 3 种浓度葛根素作用 VSMC 后，均诱导 VSMC 凋亡，无明显剂量依赖关系。荧光显微镜观察葛根素作用的 USMC 色质。NA 在胞核内形成较大凝聚块（图 8-19）；流式细胞仪检测均出现与 G_1 峰明显分开的的凋亡峰。



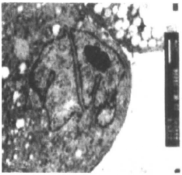
(a) 对照组　　(b) 葛根素 (10^{-7}mol/L)

图 8-19　荧光显微镜观察血管平滑肌细胞凋亡（40×）

透射电镜观察可见葛根素组的凋亡细胞染色质致密，固缩边缘化，凝固成斑块状（图 8-20 中白色箭头所示）。而对照组细胞染色质分布均匀，未见典型的凋亡改变。



(a) 对照组



(b) 葛根素 (10^{-7}mol/L)

图 8-20 透射电镜观察血管平滑肌细胞凋亡（4000×）

② 差异显示分析 应用 4 种锚定引物（T 引物）和 4 种随机引物（P 引物）的不同组合进行 mRNA 差异显示，发现两种细胞的基因表达存在明显差异，有些基因经葛根素诱导后表达增加，而有些基因表达则降低或完全被抑制（图 8-21）。提示这些基因表达增加或减少可能与葛根素诱导的细胞凋亡过程有关。

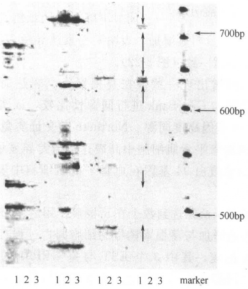
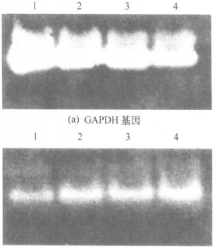


图 8-21 葛根素调节兔 VSMC 凋亡相关基因聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

（黑色箭头所指为葛根素组表达而对照组未见表达的基因片段）

1—葛根素；2—对照组；3—其他黄酮药物

③ cDNA 片段的序列测定及同源性分析 选择了 10 个葛根素诱导后表达明显上调的 cDNA 片段，克隆到 pGEN＋TEasy 中，经转染后，利用互补现象来筛



(a) GAPDH 基因

(b) GRP94 基因

图 8-22　葛根素诱导人脐静脉平滑肌细胞 GRP94 mRNA 表达

1—对照组；2—葛根素（10^{-7}mol/L）；3—葛根素（5×10^{-7}mol/L）；4—葛根素（2.5×10^{-6}mol/L）

选重组质粒。发现 pGEN＋TEasy 载体插入位点两边各有一个 *Eco*R Ⅰ酶切位点，酶切后；1%凝胶电泳，证明有 750bp 的 cDNA 插入片段。其序列通过 Blast 软件将其与 NCBI 的 NR 库和 ES 库进行同源性比较，结果发现，其中 3 个 EST 均与兔的葡萄糖调节蛋白 94（glucose-regulated protein 94，GRP94）具有 100%同源性，与人的 GRP94 同源性是 85%。这 3 个 EST 不含两端引物的序列长度分别为 652130、733130 和 761600。

④ 候选 cDNA 片段 Northern 杂交　为验证差异片段的可靠性，以^{32}P 标记与兔 GRP94 基因高度同源的 761 bp 片段为探针，分别对不同浓度葛根素诱导的 VSMC 总 RNA 进行 Northern 杂交。结果发现，随着葛根素浓度的增加，GAPDH 表达量明显下降，表明细胞总体基因表达水平下降；而 GRP94 基因表达量明显增加，表明葛根素诱导兔 VSMC 中 GRP94 表达增加，并与差异显示图谱一致（图 8-22）。

【附】 差异显示图谱出现一些仅在葛根素组高表达而在对照组无表达的 cDNA 片段。将其序列与 GeneBank 进行同源性比较，证实其中 3 个序列均与兔葡萄糖调节蛋白 94 基因高度同源。Northern 杂交证实兔葡萄糖调节蛋白 94 基因在葛根素作用的血管平滑肌细胞中高表达，与差异显示图谱一致。灰度扫描分析，兔葡萄糖调节蛋白 94 基因在血管平滑肌细胞中表达量与葛根素浓度成正比。

本研究应用差异显示法筛选到数个在葛根素作用后 VSMC 上调的 EST，提示可能这些基因的表达增加与葛根素诱导的细胞凋亡过程有关。上述 EST 克隆测序后与 GeneBank 比较，其中 3 个 EST 与兔 GRP94 的 NA 序列同源性达 100%，与人 GRP94 同源性达 85%以上。由于假阳性高是 mRNA 差异显示法最显著的缺点，因此须经过鉴定筛选出的差异片段是否是真正来源于药物作用后的细胞，以提高差异显示的可靠性。Northern 印迹分析是目前经典验证方法。以^{32}P标记的兔 GRP94 基因 cDNA 片段为探针，与葛根素作用的 VSMC 进行 Northern 杂交。结果发现，GRP94 基因在葛根素作用的 VSMC 中表达增高，而在正常对照细胞中表达较低，与差异显示图谱一致。

7. 烟碱

【来源】 本品为茄科植物烟草（*Nicotian tabacum* L.）等叶中的成分（烟碱，nicotine）。

【诱导基因的差异表达】

提取以烟碱处理培养的胎儿脐静脉内皮细胞的 RNA，利用 mRNA 差异显示技术显示差异表达 cDNA 片段（EST），经 Northern 印迹证明并测序，经基因库比较查询。

（1）人脐静脉内皮细胞（HUVEC）的培养　烟碱培养 HUVEC 组：参照 Gimbrone 等的方法并做改进。当内皮细胞培养在 24mL 培养瓶中亚融合时弃去培养液，PBS 液洗 2 次，然后用含与吸烟人群平均血清 4 度相同烟碱（10^{-7} mol/L）M199 完全培养基继续培养 24h 弃去培养液，－70℃保存备用。同时设无烟碱对照 HUVEC 组。

（2）mRNA 差异显示

① EST 的序列测定　使用 373A DNA 测序自动分析仪，Taq 酶荧光标记引物循环测序法测序。

② Northern 印迹

a. 探针制备。酶切反应：取 10μg 质粒 DNA，加入 10×*Eco*R Ⅰ缓冲液及 50U *Eco*R Ⅰ，双蒸馏水补足反应体积，37℃酶切 2h 以上，用琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切结果。探针回收：待酶切完全后，用 1mL 5mol/L NaI 于 60℃溶解凝胶，加入 1mL 树脂，室温 5min，然后用套上过滤柱的注射器滤过，去掉洗脱液；加入 2mL 80％的异丙醇洗涤小柱子，取下小柱子套上一个新的 1.5mL 反应管，离心 20s（13000r/min），室温 5min，然后加入适量的预热到 75℃的 65％TE 缓冲液（pH7.0）洗脱 DNA，离心 3min（12000r/min），收集 DNA，电泳鉴定并定量，－20℃保存备用。探针标记：按照随机引物标记试剂盒说明书进行。

b. 预杂交反应将转 RNA 的尼龙膜放入杂交袋，加入适量的预杂交液，去气泡并封口，65℃保温 3h；剪开杂交袋，倒出预杂交液，每袋加入适量的预杂交液和标记探针，立即封口，放置 65℃保温 72h；用 2×SSC（含 0.1％ SDS）于 65℃水浴中洗膜 3 次，每次 30min，膜干后压片，置－70℃，72h 洗片。

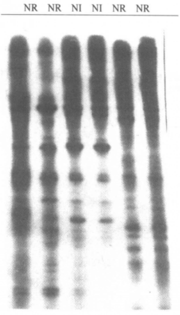


图 8-23　PAGE 放射自显影图

(3) 结果

① 对照组和烟碱组 HUVEC mRNA 的差异显示　对照组和烟碱组 HUVEC 的 mRNA 经反转录 cDNA 后同时用上游引物和下游引物扩增，产物经 PAGE 电泳后放射自显影，发现 60 个差异条带，提示两组 HUVEC 之间 mRNA 的差异，有可能反映了两组间基因表达差异。图 8-23 为烟碱组 HUVEC 其中 1 个差异带 CY31 的放射自显影图。

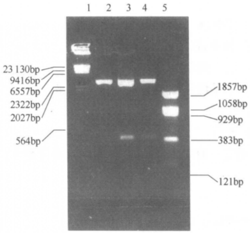


图 8-24　*EcoR* Ⅰ酶切后重组质粒（B_0，B_1，B_2）PCR 产物的 1%凝胶电泳图谱

1—λDNA/*Hind*Ⅲ marker；2—B_0/*EcoR* Ⅰ；3—B_1/*EcoR* Ⅰ；4—B_2/*EcoR* Ⅰ；5 —pBR322/*Bst*N Ⅰ marker

② 对照组与烟碱组 HUVEC 差异表达 cDNA 片段（EST）的克隆　从 PAGE 切下 EST，处理后以同样引物扩增，克隆到 pGEN-TEasy 中，经转化后，利用互补现象来筛选重组质粒。本实验挑选两个阳性克隆 1 和 2（白色）及一个阴性克隆（蓝色），pGEN-T Easy 载体插入位点两边各有一个 *EcoR* Ⅰ酶切位点，酶切后进行 1%凝胶电泳，证明有 380bp 左右的 cDNA 插入片段（图 8-24、图 8-25）。

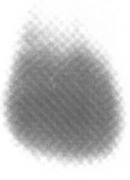


图 8-25　Northern 印迹结果

【附】 采用 mRNA 差异显示试剂盒优化引物设计，其随机组合的 10 个锚定引物和 9 个 oligo（dT）几乎完全满足整个基因组 DNA 扩增的需求。发现 60 条 EST，Northern 印迹证实 23 条 cDNA 确属差异表达片段，测序发现 11 条未见报道同源序列的 EST。

8. 雄黄

【来源】 本品为硫化物类雄黄族雄黄。

【基因表达谱芯片检测】

采用急性单核细胞白血病细胞株 U937，用 Cy3 和 Cy5 两种不同荧光染料，通过逆转录反应将硫黄中的硫化砷处理前后的 U937 mRNA 分别标记成两种探针，并与载有一组靶基因的基因表达谱芯片进行杂交，经扫描、计算机软件分析寻找经硫化砷作用前后表达有差异的基因。

（1）材料 硫化砷，纯度 99.99%以上，0.2mol/L NaOH 溶解，HCl 中和滴定至 pH7.35～7.45，制成 0.1%的储存液，4℃保存。

（2）细胞培养 取 U937 细胞（1×10^5 个/mL）置于不含或含不同浓度硫化砷的新鲜 RPMI 1640 培养液中（含 10%小牛血清，1mmol/L 谷氨酰胺，1mmol/L丙酮酸，100U/mL 青霉素和 100U/mL 链霉素），于 37℃、5%CO_2 湿空气中培养。

（3）应用基因表达谱芯片检测经硫化砷作用后 U937 细胞基因表达谱的变化

① 芯片预杂交 芯片置 95℃双蒸水浴中 2min，取出后置无水乙醇中 30s，室温晾干，将杂交试剂滴加到芯片上，盖上盖玻片，置于含少许双蒸水的保湿杂交舱中，用封口膜封口，42℃水平放置 5h。

② 探针制备 用 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒抽提 RNA，用 Oligotex mRNA Midi Kit 纯化 mRNA，电泳，分光光度计测 A_{260}/A_{280}，以鉴定 mRNA 质量。样品 mRNA 经逆转录反应，制成带荧光标记的 cDNA 探针（用 Cy3-dUTP 标记）。

【附】 筛选出与细胞骨架、代谢相关酶和与细胞信号转导等相关的表达有差异的基因共 7 条，其中 1 条表达上调，6 条表达下调。

细胞骨架和细胞信号转导的改变，可能参与硫化砷促进 U937 细胞凋亡的过程。

9. 苦参碱

【来源】 本品为豆科植物苦参（*Sophora flavescens* Ait.）等槐属植物的干燥根中提取的生物碱。

【诱导 K562 细胞分化相关 cDNA 的克隆】

（1）材料 人白血病细胞株 K562，苦参碱（matrine）。

（2）总 RNA 提取试剂盒，DDRT-PCR 全套引物，dCTP 等。

（3）方法

① 细胞培养 取对数生长期的人白血病细胞株 K562，用含 10%小牛血清的 RPMI 1640 培养液，调节细胞数为 1×10^5 个/mL，加入苦参碱使其终浓度为 0.1mg/mL，对照组除未加苦参碱外其余与处理组相同。处理组与对照组细胞在 37℃、5%CO_2 条件下培养 48h。

② 细胞总 RNA 的提取　按照试剂盒说明书分别提取苦参碱处理组及对照组 K562 细胞的总 RNA。分别取 50μg 总 RNA，加入 10U RNase 抑制剂，10U 无 RNase 的 DNase 于 50μL 反应体系中 37℃孵育 30min，酚-氯仿提取后，乙醇法沉淀总 RNA，取适量 DEPC 水溶解后测得 $A_{260}/A_{280}=1.9\sim2.0$，放置于－20℃冰箱备用。

③ 引物设计　下游引物共 4 个，各由 14 个碱基组成，序列为 T12MN(M＝A，G，C；N＝A，T，G，C)，上游引物含 10 个碱基，共 20 种。

④ mRNA 的逆转录取　1.0μg 经不同处理的 K562 细胞的 RNA，在 20μL 反应体系中加入终浓度为 2.5μmol/L 的上游引物、10U 的 RNase 抑制剂（GIBCO BRL)、300U 的 MMLV 逆转录酶、MMLV 逆转录酶反应缓冲液、10mmol/L 的 DTT、20μmol/L 的 dNTP，混匀后 37℃下孵育 60min，反应完毕后 95℃水浴 5min 以终止反应，4℃放置。

⑤ cDNA 扩增　以逆转录产物为模板进行 PCR 扩增，反应体系共 20μL，含 2μL 逆转录产物、1×PCR 缓冲液、2.5μmol/L 下游引物、1μmol/L 上游引物、20μmol/L dNTP、5μCi[α-^{32}P]dCTP（1Ci＝37GBq)、1.5U Taq 聚合酶。反应条件：变性 94℃ 30s，退火 40℃ 2min，延伸 72℃ 30s，反应 40 个循环后，72℃延伸 7min。

⑥ cDNA 扩增片段电泳　PCR 产物与样品缓冲液混合后，在 6%非变性聚丙烯酰胺凝胶上以 60W 恒功率电泳 3h，凝胶于 80℃干燥 30min。－20℃曝光过夜，次日显影。

⑦ 特异带的获得　在显影的 X 射线胶片上寻找在苦参碱处理组与对照组之间有明显差异的条带。将 X 射线片与凝胶对齐，用锋利的刀片切下与差异条带相对应的凝胶条放入一只离心管中，加入 100μL 三蒸水，室温孵育 10min，100℃煮沸 15min，取 6μL 为模板，除不加同位素外，按前述 PCR 条件再次扩增，电泳检查后进行亚克隆。

⑧ 目的序列的亚克隆　按照试剂盒说明书将扩增的 PCR 产物与 pGEN-T Easy Vector 连接，转化 *E. coli* JM109 菌株。提取质粒，用 *Eco*RⅠ内切酶消化，鉴定重组子。

⑨ 斑点杂交　用对照 K562 细胞及苦参碱作用 48h 后的 K562 细胞的 RNA 进行逆转录，同时掺入放射性底物［α-^{32}P］dCTP 进行 cDNA 单链标记作为探针筛选重组克隆。

(4) 结果　见图 8-26、图 8-27、图 8-28、图 8-29。

【附】 苦参碱处理前后 K562 细胞 mRNA 的差异显示利用苦参碱处理前后 K562 细胞的总 RNA，去除残留的 DNA 之后，由下游引物逆转录成 sscDNA，再加上 10 个碱基的上游引物扩增后进行电泳，成功显示了苦参碱处理组与对照组之间

的差异带。从聚丙烯酰胺凝胶上共回收了数十条有明显差异的 cDNA 片段。

重组子的酶切鉴定：重组质粒经内切酶 *Eco*R Ⅰ 消化后，琼脂糖凝胶电泳可见插入片段。

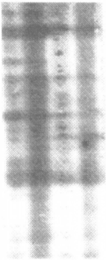


图 8-26 聚丙烯酰胺凝胶电泳放射自显影图

1，3—苦参碱处理的 K562 细胞；

2，4—对照 K562 细胞

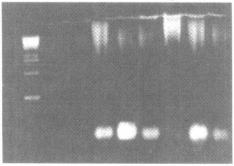


图 8-27 差异 cDNA 的再次扩增

M—分子量标准

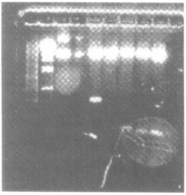


图 8-28 差异 cDNA 重组子的酶切鉴定

M—分子量标准；1—阳性对照；

2，3，4，5—cDNA 插入片段

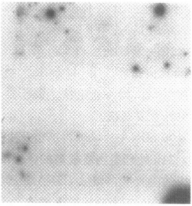


图 8-29 mRNA 异克隆的差别杂交

(a) 对照 K562 细胞制备的探针；

(b) 苦参碱处理 K562 细胞制备的探针

10. 紫杉醇

【来源】 本品为杉科植物红豆杉中提取的抗癌成分。

【诱导表达基因克隆的mRNA差异显示分析】

（1）材料　DMEM培养液，紫杉醇（Taxol，相对分子质量853.9，纯度97.4%），RNA Transcription Kit等。

（2）方法

① 细胞培养和药物　人乳癌细胞（BCap37）在含10%小牛血清，青霉素、链霉素各100U/mL的DMEM培养液中进行培养，细胞培养箱内含5% CO_2，温度为37℃。紫杉醇溶解在二甲基亚砜中，工作浓度为100nmol/L。当细胞生长面积占培养皿（90mm直径）70%左右时，分别给予紫杉醇处理3h和24h，另设空白对照。

② 总RNA分离提取　每组收集细胞约 2×10^6 个，PBS洗两次，悬于5mL异硫氰酸胍（4mol/L）细胞溶解液中，用23mg孔径注射针抽推数次以破碎细胞。加入0.5mL乙酸钠，经酸性酚和氯仿抽提两次后，用异丙醇沉淀总RNA。用紫外分光光度仪以260nm/280nm波长测算总RNA的量和纯度。

③ PCR介导mRNA差异显示法　采用RNAmap试剂盒A和C并按试剂盒实验方法进行，以紫杉醇处理3h和24h以及空白对照组的总RNA作为合成cDNA链的模板。mRNA锚定引物（或称3′端引物）和5′端引物（10种）均由试剂盒提供。mRNA 3′端引物分别为T12MA、T12MC、T12MG或者T12MT（M为A、G、C 3种碱基的随机选取）四种。cDNA第一链反应体系（20μL）包括：总RNA0.2μg，3′端引物2.0μmol/L，dNTP20μmol/L，逆转录酶缓冲液4μL（5倍），MMLV逆转录酶100U。反应条件为37℃，1h。cDNA片段PCR扩增反应混合液体积为20μL，包括3′端和5′端引物分别为10μmol/L和0.2μmol/L、dNTP 2.0μmol/L、PCR反应缓冲液2μL（10倍）、^{35}S α-dATP 1U Ci（1Ci=37GBq）和Taq酶1U。扩增条件为94℃ 30s，42℃ 2min，72℃ 30s，40个反应循环。用6U PCR产物在变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳，溴酚蓝指示剂距前沿5cm处终止电泳。负压烘干凝胶，放射自显影18～24h。上述PCR扩增和电泳重复两次。

④ cDNA片段的再扩增及克隆　选取3种中有明显差异的cDNA片段，例如，24h处理组密度较高的条带或对照组密度较高的条带。通过X射线片标记在对应的凝胶上，切取cDNA条带。放入0.5mL离心管中，加入100μL超纯水，煮沸10min，离心后取上清液4μL用PCR再扩增。PCR再扩增总体积为40μL，包括PCR缓冲液4μL、dNTP 20μmol/L、3′端和5′端引物分别为10μmol/L和0.2μmol/L、Taq酶1U；反应条件同上。PCR再扩增产物经1.0%琼脂糖凝胶（含溴化乙锭0.05μg/mL）电泳分析。切取PCR扩增的cDNA条带，用Geneclean试剂盒纯化cDNA，然后用TA cloning试剂盒把扩增得的cDNA连接于PCR Ⅱ载体的*Eco*RⅠ位点。经转化实验后获得一批相应的cDNA克隆。

⑤ cDNA 序列测定　按 Sanger 等双脱氧核苷酸法，采用 Sequenase Kit 2.0 和 ^{36}S α-dATP，分别用 T7 和 Sp6 启动子引物从两端测定克隆化 cDNA 全长序列。各 cDNA 序列再与 GenBank 和 EMBL 基因信息库中存储的 cDNA 序列进行同源性匹配。

⑥ Northern 杂交分析　3 组各含 10μg 总 RNA，在含 3.3%甲醛的 1.2%琼脂糖凝胶电泳分带后，溴化乙锭染色 10min，观察 18S rRNA 和 28S rRNA 带的光亮度和形状，以保证总 RNA 质量和电泳效果。再把 RNA 转移至 HybondN^{+} 尼龙膜上，经紫外线交联固定。以克隆 cDNA 为模板，用 RNA Transcription Kit 制备 ^{32}P 标记的 RNA 探针，探针放射活性比为 1×10^{7}cpm，含 RNA 膜预杂交 3h 后，加入探针杂交过夜，杂交液为 7%SDS、0.25mol Na_2HPO_4、1mmol EDTA 和 100μg/mL 酵母 tRNA。杂交后洗膜液为 2×SSC/0.1% SDS 和 0.1×SSC/0.1% SDS，共 3 次，每次 65℃，各 21min。

(3) 结果　见图 8-30、图 8-31、图 8-32、表 8-6。

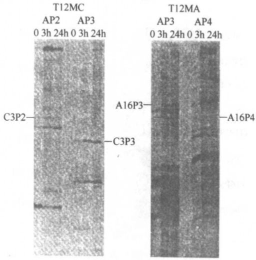


图 8-30　mRNA 差异显示法，T12MN 和 AP*n* 引物扩增紫杉醇

（醇处理 0、3h 和 24h 诱导的表达差异 cDNA 条带 C3P2、C3P3、A16P3 和 A16P4）

【附】 图8-30 显示：cDNA 条带 C3P3、A16P3 和 A16P4 信号在处理 24h 组最强，C3P2 信号强度在处理 3h 组高于 24h 组。35 个 cDNA 条带经 PCR 再扩增和克隆转化试验后，获得 25 个 cDNA 克隆。部分 cDNA 克隆琼脂糖凝胶电泳分析见图 8-31。通过 DNA 序列分析，显示上述 25 个 cDNA 克隆的 poly(A) 尾端在 PCR Ⅱ 载体上的方向以及 cDNA 片段全长序列。结果显示，cDNA 克隆序列全长在 189～490 个碱基对（bp）不等，cDNA 两端序列均与选用的 3′端和 5′端引物序列吻合。

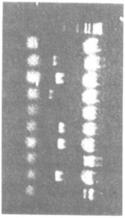


图 8-31　部分 cDNA 克隆 *Eco*R Ⅰ 酶切后 1.0%琼脂糖凝胶电泳图谱

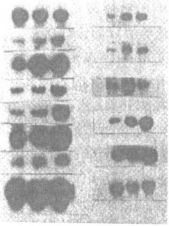


图 8-32　18 个 cDNA 克隆在紫杉醇处理 0、3h、24h 的 Northern 杂交反应结果

用 mRNA 差异显示技术共获得 35 条密度有明显差异的 cDNA 条带，绝大部分是在紫杉醇处理 3h 和 24h mRNA 呈高表达。经过 PCR 再扩增、质粒载体重组和转化过程，只获得 25 个 cDNA 克隆，丢失 10 个 cDNA 片段。cDNA 克隆中仅 12 个 cDNA 克隆有明显的 mRNA 水平表达的差异。提示应用 mRNA 差异显示技术获得的 cDNA 克隆有较高的假阳性率，即用 PCR 扩增得到的有差异 cDNA 片段，在 mRNA 水平表达并无差异，甚至不表达。

mRNA 差异显示技术在筛选和克隆 mRNA 水平表达有差异的基因方面是可行的和有效的。

表 8-6　12 个紫杉醇诱导的与细胞凋亡潜在相关的 cDNA 克隆

克隆	mRNA 差异显示			Northern 杂交			探针大小/kb	转录子大小/kb	同源性序列	一致率/%
	0	3h	24h	0	3h	24h				
AOP1	+	−	−	++	+	+	490	5.2	人锌指蛋白	78
A16P3	+	++	++	+	++	++	365	2.2	人 ATP 合成酶 β 基因	83
A16P4	−	++	++	+	++	++	338	1.8	无	
A24P11	+	+	++	−	−	++	347	5.2	人 ras 相关 GTP 结合蛋白	95
G3P2	+	++	+	+	++	+	341	5.3	无	
C3P3	+	++	++	+	++	+++	290	3.3	人腺苷基蛋氨酸合成酶	89
C16P4	+	++	++	+	++	+++	295	2.4	人线粒体基因	92
C24P15	+	++	++	+	+	++	259	5.2	无	
G16P1	+	+	++	−	+	++	405	1.7	无	
G3P13	+	++	++	+	+	+++	269	5.2	无	
T3P3	+	++	+	++	++	+++	189	2.1	无	
T16P5	+	++	++	+	+	++	230	2.1	人 HFBD cDNA	83

参　考　文　献

1　何祖华，李德葆．研究基因表达的新方法—mRNA 差别显示（Differential Display）：原理和应用［J］．生命科学，1994，6（5）：28～30

2　王西平，刘振中，秦宝福等．mRNA 差异显示技术及其在植物生理研究中的应用［J］．西北农业大学学报，2000，28（6）：197～202

3　黄薇，方孝东，赵文明等．分离差异表达基因的方法［J］．生物工程学报，2002，18（4）：521～524

4　马月萍，戴思兰．mRNA 差别显示技术及其在植物基因研究中的应用［J］．北京林业大学学报，2003，25（2）：81～82

5　李同祥，王进科．基因芯片与植物基因差异表达分析［J］．植物研究，2002，22（3）：310～313

6　章军建．基因芯片在医学研究中的应用［J］．国外医学 遗传学分册，2002，25（1）：7～11

7　李德良．基因芯片技术在药物研究中的应用［J］．国外医学药学分册，2003，30（2）：37～41

8　徐炳森，邵健忠．几种新型生物芯片研究进展［J］．生物化学与生物物理学进展，2000，27（3）：251～254

9　Ramsay R. DNA chips：state-of-the art［J］. Nature Biotechnology 1998；16：40～44.

10　涂洪斌，卫剑文等．赤魟尾刺 cDNA 表达文库的构建．药学学报，2001，36（12）：906～909

11　熊玉梅，凌敏华等．两个东亚钳蝎抗哺乳动物神经毒素的 cDNA 序列［J］．生物化学与生物物理学报，1997，29（2）：200～205

12　李建民，王义权，周开亚等．眼镜蛇毒腺 cDNA 文库的构建［J］．蛇志，1999，11（3）：

9～11
13 王晓路，Bent Havsteen，邵靖宇．眼镜蛇血清解毒蛋白基因的分子克隆和序列分析［J］．中国医学科学院学报，1996，18（4）：263～272
14 姬可平，李啸红，李应东等．应用 rRNA 基因间隔区碱基测序对中药（大黄）进行鉴定．世界科学技术．2002，4（4）：44～48
15 王绿娅，刘舒等．葛根素能诱导血管平滑肌细胞凋亡部分相关基因差异表达．中国动脉硬化杂志，2002，10（6）：487～490
16 闫道广，罗深秋，陈保生．烟碱诱导基因的差异表达．第一军医大学学报，2000，20（3）．236～238
17 顾春红，陈芳源，韩洁英，邵念贤，欧阳仁荣．硫化砷作用后 U937 细胞基因表达谱变化的研究．诊断学理论与实践．2002，1（2）：85～87
18 张彦，蒋纪恺，刘小珊等．苦参碱诱导 K652 细胞分化相关 cDNA 的克隆．重庆医科大学学报，2000，25（4）：337～339
19 陈丽荣，郑树，范伟民．mRNA 差异显示技术在紫杉醇诱导的表达基因克隆中的应用［J］．浙江医科大学学报．1997，26（6）：241～245

（李晓波，李仁伟，张贵君）